

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L' UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

**Discipline : Biologie**

Présentée et soutenue publiquement par

**Estelle PAGLIERO**

Le 2 février 2006

**Etude fonctionnelle de Pmp23**  
**une nouvelle enzyme de clivage du peptidoglycane**  
**chez *Streptococcus pneumoniae***

**Composition du Jury**

<b>Président</b>	<b>M. Dominique SCHNEIDER</b>
<b>Rapporteur</b>	<b>M. Michel ARTHUR</b>
<b>Rapporteur</b>	<b>M. Ivo BONECA</b>
<b>Examineur</b>	<b>M. Otto DIDEBERG</b>
<b>Directeur de thèse</b>	<b>M. Thierry VERNET</b>

**Thèse préparée au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules de  
l'Institut de Biologie Structurale *Jean-Pierre Ebel***

**A ma fille Lili,  
à mon fils Pierre,  
et à tous ceux que je  
porte dans mon cœur**

## Table des matières

<b>Présentation bibliographique</b> .....	1
<b>Le peptidoglycane</b> .....	5
I. Structure et composition du peptidoglycane .....	5
II. Synthèse du peptidoglycane .....	6
II.1. Formation du précurseur du peptidoglycane, le lipide II, dans le cytoplasme .....	7
II.2. Etapes finales extracellulaires de la synthèse du peptidoglycane .....	8
II.3. Les enzymes de clivage du peptidoglycane sont-elles impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane ? .....	11
IV. Intérêt de l'étude des hydrolases du peptidoglycane .....	14
<b>Les hydrolases du peptidoglycane</b> .....	15
I. Les différentes enzymes de clivage du peptidoglycane .....	15
I.1. Clivage des liaisons glycosidiques .....	16
a. <i>β-N-acétylglucosaminidases</i> .....	16
b. <i>Lysozymes et transglycosylases lytiques</i> .....	16
I.2. Clivage de la liaison amide entre MurNAc et la partie peptidique du peptidoglycane .....	20
I.3. Clivage des liaisons peptidiques .....	20
a. <i>Carboxypeptidases</i> .....	20
b. <i>Endopeptidases</i> .....	21
II. Caractérisation enzymatique de l'activité de clivage du peptidoglycane .....	22
II.1. Méthodes permettant de détecter une activité hydrolytique .....	22
II.2. Analyse de mucopeptides .....	23
III. Fonctions associées aux enzymes de clivage du peptidoglycane .....	23
III.1. Autolyse .....	24
III.2. Croissance bactérienne et division cellulaire .....	25
III.3. Dégradation du peptidoglycane, recyclage et induction des β-lactamases .....	28
III.4. Virulence et pathogenèse .....	30
III.5. Sporulation et germination .....	31
III.6. Système de sécrétion de type IV .....	33
III.7. Formation des flagelles .....	33
IV. Régulation de l'activité des hydrolases .....	34
IV. Conclusion .....	35
<b>Le métabolisme du peptidoglycane chez <i>S. pneumoniae</i></b> .....	38
I. <i>S. pneumoniae</i> , un pathogène de l'homme devenu résistant aux antibiotiques .....	38
II. La synthèse du peptidoglycane chez <i>S. pneumoniae</i> .....	39
II.1. Les PBPs de haut poids moléculaire de <i>S. pneumoniae</i> .....	39
II.2. Croissance et division cellulaire chez <i>S. pneumoniae</i> .....	41
II.3. PBP3, une D,D-carboxypeptidase impliquée dans la régulation de la division cellulaire chez <i>S. pneumoniae</i> .....	41

III. Les enzymes de clivage du peptidoglycane de <i>S. pneumoniae</i> . . . . .	43
III.1. Topologie des hydrolases du peptidoglycane de <i>S. pneumoniae</i> . . . . .	44
III.2. Fonctions des hydrolases du peptidoglycane de <i>S. pneumoniae</i> . . . . .	45
III.2.1. Autolyse . . . . .	45
III.2.2. Séparation des cellules filles . . . . .	45
III.2.3. Transformation génétique et compétence . . . . .	47
III.2.4. Virulence et pathogénèse . . . . .	48
III.3. La désacylation du peptidoglycane pourrait-elle réguler l'activité des hydrolases chez <i>S. pneumoniae</i> ? . . . . .	49
IV. Conclusion . . . . .	50

## **Présentation des travaux . . . . . 51**

## **Contributions aux travaux . . . . . 54**

## **Matériels et méthodes . . . . . 55**

Avertissement aux lecteurs . . . . .	55
I. Production des anti-corps dirigés contre Pmp23 . . . . .	55
I.1. Production d'anti-corps de lapin dirigés contre la protéine dénaturée H6-Pmp23* . . . . .	55
I.2. Production d'anti-corps de souris dirigés contre GST-Pmp23 . . . . .	56
I.3. Production d'anti-corps de lapin dirigés contre des peptides synthétiques de Pmp23 . . . . .	57
II. Western-blot . . . . .	57
III. Immunolocalisation . . . . .	58
IV. Détermination de l'activité de clivage du peptidoglycane . . . . .	58
IV.1. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) . . . . .	59
IV.2. Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) . . . . .	59

## **Présentation de la publication n°I . . . . . 61**

The PECACE domain: a new family of enzymes with potential peptidoglycan cleavage activity in Gram-positive bacteria

## **Présentation de la publication n°II . . . . . 64**

The inactivation of a new peptidoglycan hydrolase Pmp23 leads to abnormal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*

## **Expériences complémentaires . . . . . 67**

I. Production d'anti-corps et immunolocalisation . . . . .	67
II. Recherche de l'activité de clivage . . . . .	69

<b>Conclusions et perspectives</b> .....	71
--	----

<b>Bibliographie</b> .....	76
----------------------------	----

<b>Annexe : publication</b> .....	89
-----------------------------------	----

Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in beta-lactam resistance

## Résumé

Le peptidoglycane est un composant majeur de la paroi cellulaire bactérienne dont l'intégrité est essentielle à la survie cellulaire. La biosynthèse du peptidoglycane est un processus régulé faisant intervenir des enzymes de synthèse, les « Penicillin-Binding Proteins », et des hydrolases qui agissent, selon toute vraisemblance, de façon concertée lors de la croissance et de la division bactérienne. La comparaison des génomes bactériens a permis d'identifier un nouveau domaine protéique, probablement impliqué dans le clivage du peptidoglycane, présent uniquement chez les bactéries à Gram positif : le domaine PECACE (PEptidoglycan CARbohydrate Cleavage Enzyme). Ce domaine, prédit pour avoir un repliement tridimensionnel analogue aux domaines catalytiques de la transglycosylase lytique Slt70 d'*Escherichia coli* et du lysozyme de type G d'oie, pourrait participer au clivage de la liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  entre les résidus acide *N*-acétyl-D-muramique et *N*-acétyl-D-glucosamine du peptidoglycane. Chez la bactérie pathogène *Streptococcus pneumoniae*, ce domaine est présent dans la région extracellulaire d'une protéine que nous nommons Pmp23 (Pneumococcal Membrane Protein). La forme recombinante de cette protéine membranaire bitopique de 23 kDa dégrade *in vitro* des extraits bactériens contenant du peptidoglycane. L'inactivation du gène *pmp23* chez *S. pneumoniae* modifie le comportement de la bactérie en culture, accroît sa sensibilité aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines et perturbe la localisation du site de division. Ces observations indiquent que Pmp23 est une hydrolase intervenant dans le métabolisme du peptidoglycane septal.

## Abstract

The bacterial peptidoglycan is the major component of the cell wall and its integrity is essential to cell survival. Peptidoglycan biosynthesis during cell elongation and division is a regulated process requiring synthetases, the "Penicillin-Binding Proteins" and most probably hydrolytic enzymes. Comparison of bacterial genomes led to the identification of a new protein domain present only in Gram-positive bacteria: the PECACE domain (PEptidoglycan CARbohydrate Cleavage Enzyme). The predicted three-dimensional fold of this domain is analogous to the catalytic site of the lytic transglycosylase Slt70 from *Escherichia coli* and of the goose-type lysozyme ones. It probably catalyzes the peptidoglycan cleavage of the  $\beta(1-4)$  glycosidic bond between *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine residues of peptidoglycan. From the pathogenic bacteria *Streptococcus pneumoniae*, this domain is found in the extracellular region of a protein we called Pmp23 (Pneumococcal Membrane Protein). The recombinant form of this bitopic membrane protein of 23 kDa degrades bacterial extracts containing peptidoglycan. Bacteria with an inactivated *pmp23* gene display a modification of their flocculation behaviour, are more sensitive to  $\beta$ -lactam antibiotics and present multiple and mislocalized septa. Taken together these observations indicate that Pmp23 is a hydrolase whose function is linked to peptidoglycan metabolism at the septum site.

## Abréviations

<b>ADN</b>	<b>Acide DésoxyriboNucléique</b>
<b>CMI</b>	<b>Concentration Minimale Inhibitrice</b>
<b>Da</b>	<b>Dalton</b>
<b>D.O.</b>	<b>Densité Optique</b>
<b>dNTP</b>	<b>2'désoxyNucléotide 5'TriPhosphate</b>
<b>EDTA</b>	<b>Acide Ethylène Diamine Tetraacétique</b>
<b>ESI-MS</b>	<b>ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry</b>
<b>Fts</b>	<b>Filamentous temperature sensitive</b>
<b>g</b>	<b>Gramme</b>
<b>GlcNAc</b>	<b>N-acétylglucosamine</b>
<b>GST</b>	<b>Glutathion-S-Transferase</b>
<b>HEPES</b>	<b>N-[2-HydroxyEthyl]Piperazine-N'[2-EthaneSulfonic acid]</b>
<b>HMW</b>	<b>High Molecular Weight</b>
<b>IPTG</b>	<b>IsoPropylThioβD-Galactopyranose</b>
<b>L</b>	<b>Litre</b>
<b>LB</b>	<b>Luria Bertani</b>
<b>LMW</b>	<b>Low Molecular Weight</b>
<b>M</b>	<b>Molaire</b>
<b>MALDI-TOF</b>	<b>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</b>
<b>μ</b>	<b>micro</b>
<b>ml</b>	<b>millilitre</b>
<b>MurNAc</b>	<b>Acide N-acétylmuramique</b>
<b>PAGE</b>	<b>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</b>
<b>PBP</b>	<b>Penicillin Binding Protein</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphate-Buffered Saline</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase Chain Reaction</b>
<b>pH</b>	<b>potentiel Hydrogène</b>
<b>PM</b>	<b>Poids Moléculaire</b>
<b>RP-HPLC</b>	<b>Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography</b>
<b>SDS</b>	<b>Sodium Dodecyl Sulfate</b>
<b>TE</b>	<b>TRIS-EDTA</b>
<b>TRIS</b>	<b>Tri (hydroxyméthyl) aminométhane</b>
<b>UDP</b>	<b>Uridine DiPhosphate</b>

## Remerciements

Je remercie tout particulièrement Thierry Vernet qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et soutenue constamment au cours de ma thèse.

J'adresse un très grand merci à Anne-Marie Di Guilmi pour le très bon encadrement dont j'ai pu bénéficier et sa disponibilité à mon égard.

Je suis très reconnaissante envers Otto Dideberg qui a initié ce projet et porté un intérêt constant à mes travaux.

J'adresse tous mes remerciements à Messieurs Dominique Schneider, Ivo Boneca et Michel Arthur pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger cette thèse.

J'exprime ma gratitude à toutes les personnes qui se sont investies dans ce projet, notamment par les collaborations que nous avons entreprises : Sébastien Guiral et Jean-Pierre Claverys pour la souche R1547 de *S. pneumoniae*, Claude Frehel pour les coupes bactériennes en microscopie électronique, Michel Arthur pour la composition du peptidoglycane des souches sauvage et mutée, sans oublier Bernard Dublet pour les très longues heures qu'il a passées à m'aider à déterminer l'activité de Pmp23, ses conseils, nos discussions amicales.

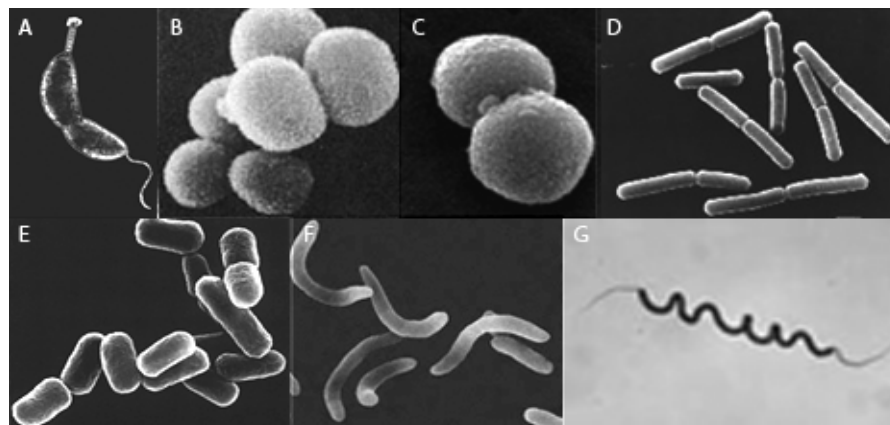
Je remercie aussi tous ceux qui m'ont soutenue et fait en sorte que mes trois années de thèse se passent pour le mieux. Je pense en particulier à tous les membres « anciens » et « actuels » du LIM, du LCM et de l'IBS en général.

Un grand merci à Sandrine pour sa relecture du manuscrit et à ma famille sur qui j'ai toujours pu m'épauler.



## Présentation bibliographique

Les premiers classements des bactéries ont été établis à partir de leur forme dont nous retrouvons la notion dans la taxonomie de certaines espèces (Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005). Les bactéries peuvent adopter des formes sphériques, cylindriques, spiralées ou encore plus complexes. Un exemple caractéristique est celui de la bactérie *Caulobacter crescentus* en forme de cylindre incurvé ou croissant (Fig.1.A.). D'autre part, les coques adoptent une morphologie allant de la sphère parfaite pour les espèces *Staphylococci* (Fig.1.B.) à légèrement aplatie pour *Neisseria gonorrhoeae* voire ovale pour les espèces *Enterococci* et *Streptococcus pneumoniae* (Fig.1.C.). Les bacilles se définissent par une morphologie cylindrique rectiligne avec extrémités rectangulaires pour les espèces *Bacilli* (Fig.1.D.), arrondies pour la famille *Enterobacteriaceae* (Fig.1.E.), ou encore renflées pour les espèces *Corynebacteria* et *Fusobacteria*. Il existe des bacilles incurvés comme les genres *Vibrio* (Fig.1.F.), *Campylobacter* ou *Arcobacter* ou encore ramifiés pour l'ordre *Actinomycetales*. Les classes *Spirochaetes*, et genres *Helicobacter*, *Spirillum* ou *Aquaspirillum* ont une forme spiralée (Fig.1.G.).



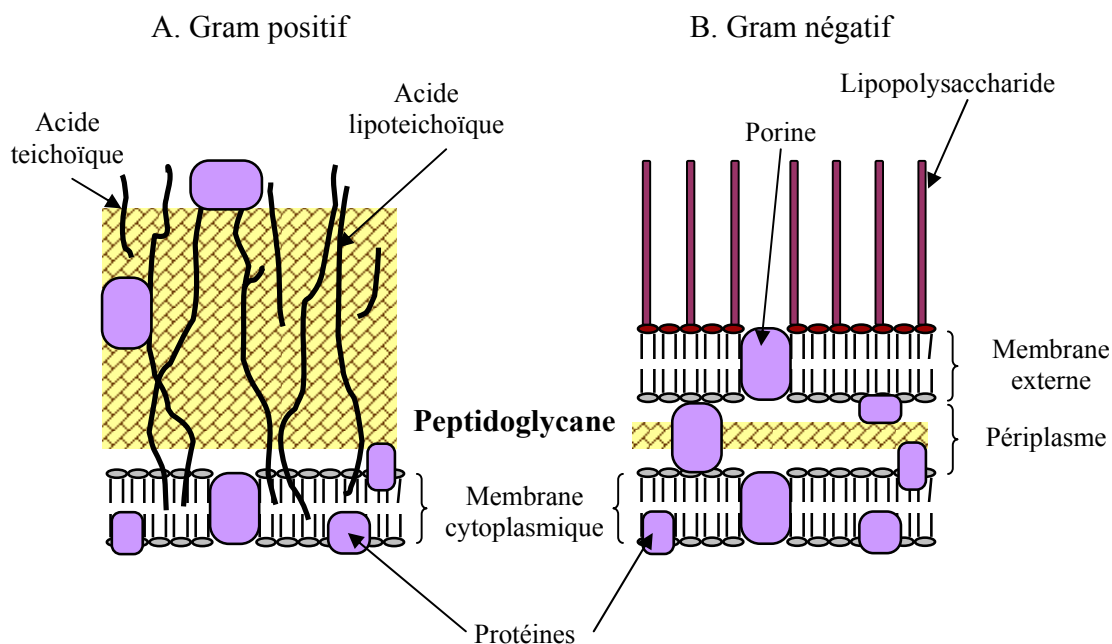
**Figure 1. Exemples de morphologie bactérienne.** A : *Caulobacter crescentus*. B : *Staphylococcus aureus*. C : *Streptococcus pneumoniae*. D : *Bacillus subtilis*. E : *Escherichia coli*. F : *Vibrio cholerae*. G : *Spirillum volutans*.

La plupart des bactéries ont, autour de leur membrane plasmique, une paroi. Cette paroi permet le maintien de la forme cellulaire, assure une protection mécanique et protège la bactérie contre les variations de pression osmotique. Les échanges avec le milieu extérieur se font également au travers de cette paroi. Un de ses principaux constituants est le peptidoglycane. Cet hétéropolymère, composé de chaînes de glycanes réticulées entre elles par de courts peptides, entoure la bactérie sur deux à plusieurs couches successives. D'autres composantes, variables selon les espèces, interviennent aussi dans l'assemblage de la paroi cellulaire. En 1884, Hans Christian Gram mit au point une technique permettant d'identifier et de classer les bactéries en deux catégories. Cette technique consiste à colorer le cytoplasme des bactéries avec un colorant basique violet, le cristal violet oxalaté et de l'iode, à les rincer dans l'alcool puis à les colorer avec un colorant rouge, la safranine. Les bactéries qui retiennent la coloration violette sont qualifiées de Gram positif alors que les bactéries qui sont décolorées par l'action de l'alcool puis recolorées en rouge sont nommées bactéries à Gram négatif. Le principe de cette coloration repose sur une différence de structure de la paroi cellulaire entre bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif (Fig.2).

Chez les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane, composé de plusieurs dizaines de couches, a une épaisseur de 20 à 80 nm (Fig.2.A.). Cette paroi renferme aussi des acides teichoïques, polymères de glycérol ou de ribitol et de phosphore fixés au peptidoglycane et des acides lipoteichoïques fixés à la membrane plasmique. Ces deux composants, indispensables à la viabilité de la cellule, pourraient intervenir dans la fixation de certaines protéines et dans le transport de molécules vers la membrane plasmique. Cette paroi chargée négativement est très polaire et imperméable aux constituants hydrophobes. Lors de l'étape de décoloration violette de Gram, l'alcool ne peut atteindre le cytoplasme des bactéries à Gram positif qui reste violet.

La paroi des bactéries à Gram négatif est plus fine et présente une structure plus complexe (Fig.2.B.). Le peptidoglycane d'une épaisseur d'environ 5 nm se situe dans l'espace périplasmique. Il est surmonté d'une membrane externe où sont présents de nombreux lipopolysaccharides assurant l'imperméabilité aux composés hydrophiles. Des porines permettent cependant le passage de petites molécules hydrophiles. Lors de la coloration de Gram, la paroi des bactéries à Gram négatif étant riche en lipides, l'alcool parvient jusqu'au cytoplasme coloré en violet et le décolore. Après recoloration par la safranine, les bactéries apparaissent en rouge.

A l'extérieur de la paroi, il peut exister des structures supplémentaires comme des capsules et des couches de surface cristallines encore appelées couches S. La capsule est très souvent constituée de polysaccharides mais peut parfois être protéique. Elle assure la protection de la bactérie contre la phagocytose par les cellules du système immunitaire de l'organisme hôte, mais aussi contre le dessèchement, les détergents et les virus. Cette capsule peut également servir à certaines bactéries pour adhérer à un substrat. Les couches S sont composées de protéines ou glycoprotéines organisées en réseaux paracrystallins. Elles joueraient un rôle en tant que squelette. Elles pourraient être impliquées dans l'adhésion, la résistance au système complémentaire et aux protéases des macrophages. Les couches S préviendraient aussi les attaques contre certains prédateurs tels que les bactériophages lytiques et les espèces bactériennes *Bdellovibrio* (Koval and Hynes, 1991).



**Figure 2. Représentation schématique de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif (A) et à Gram négatif (B).** A : la paroi des bactéries à Gram positif est composée d'épaisses couches de peptidoglycane sur lesquelles sont liés des acides teichoïques. Des acides lipoteichoïques sont fixés à la membrane plasmique. B : les bactéries à Gram négatif possèdent une couche plus fine de peptidoglycane surmontée d'une membrane externe sur laquelle sont fixés des lipopolysaccharides. Le peptidoglycane est localisé dans l'espace périplasmique, entre les membranes cytoplasmique et externe. Des porines assurant le passage de petites molécules hydrophiles sont présentes dans la membrane externe.

Notons que les mycoplasmes ainsi que les *Archaea* ne possèdent pas de peptidoglycane. En effet, la paroi de ces dernières est estérifiée et constituée d'une pseudomuréine non caractérisable par la coloration de Gram.

Comme nous venons de le voir, un des composants communs à la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif est le peptidoglycane. Il est à l'interface entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme bactérien. Son intégrité, essentielle à la survie cellulaire, doit donc être maintenue au cours de la croissance et de la division cellulaire. En effet, l'endommagement du peptidoglycane conduit à la lyse bactérienne. Ainsi, un grand nombre d'antibiotiques tels que les  $\beta$ -lactamines, les glycopeptides, la fosfomycine ou encore la bacitracine agissent en inhibant la synthèse du peptidoglycane. Cependant, face à l'utilisation massive et croissante d'antibiotiques, des bactéries résistantes à ces molécules sont apparues dès la fin des années 50. Cette situation s'est aggravée avec le temps et actuellement, en France, près de 50% des souches de *S. pneumoniae* isolées sont résistantes à la pénicilline G et certaines à toutes les  $\beta$ -lactamines (Laurans *et al.*, 2001). Deux stratégies sont possibles pour lutter contre cet accroissement de la résistance : la première repose sur l'approfondissement de notre connaissance des mécanismes de résistance afin d'améliorer les antibiotiques existants. La seconde stratégie consiste à étudier les fonctions vitales de la bactérie. Or nous venons de voir que pour survivre, la bactérie doit garder un peptidoglycane intègre durant les processus de croissance et de division. Une bonne connaissance du métabolisme du peptidoglycane devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

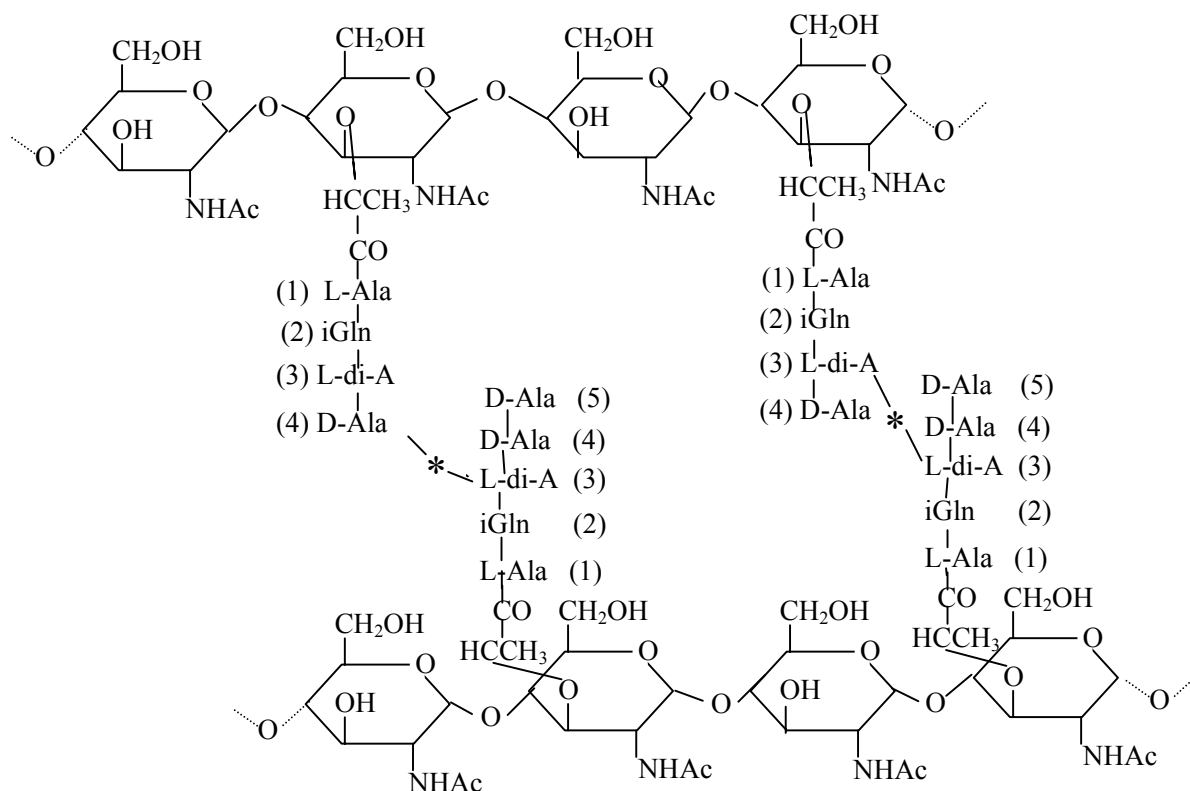
Nous nous sommes donc intéressés, dans cette présentation bibliographique, à la structure et à la synthèse du peptidoglycane, puis plus spécialement aux enzymes de clivage qui interviennent dans de nombreux phénomènes vitaux pour les bactéries, avant de décrire plus spécifiquement le métabolisme du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*, bactérie pathogène objet de notre travail expérimental.

## Le peptidoglycane

### I. Structure et composition du peptidoglycane

Le peptidoglycane se compose de chaînes de glycanes réticulées entre elles par de courts peptides (Fig.3). Ces chaînes sont formées de répétition d'unités disaccharidiques composées de *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) relié par une liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  à un acide *N*-acétyl-D-muramique (MurNAc). Un pentapeptide comprenant un acide aminé dibasique, qui permettra la formation d'un pont peptidique inter-chaîne, s'ancree sur le groupement carboxyle de l'acide lactique de MurNAc par l'intermédiaire d'une liaison amide (Fig.3). Ce pentapeptide est composé d'un enchaînement d'acides aminés des séries L et D : L-alanine (1), D-glutamate ou D-isoglutamine (2), L-lysine ou acide *méso*-diaminopimélique (3), D-alanine (4) et D-alanine (5). La plupart des bactéries à Gram négatif et quelques bactéries à Gram positif comme *Bacillus subtilis* possèdent un acide *méso*-diaminopimélique en position 3 alors que la plupart des bactéries à Gram positif dont *S. pneumoniae* ont une L-lysine. *S. pneumoniae* possède un D-isoglutamine en position 2. Cette liste n'est pas exhaustive et des acides aminés comme des glycines, L-sérines, L-thréonines, ou encore acides D-aspartiques peuvent faire partie du peptidoglycane (Ghuysen, 1968). Les parties peptidiques de deux unités différentes sont reliées entre elles par un pont interpeptidique, entre, généralement, les acides aminés D-alanine (4) et l'acide aminé dibasique (3). Il existe aussi, une faible proportion de liaisons de type L,D entre deux acides aminés dibasiques (3). Chez *Escherichia coli*, le pontage est direct. Chez *S. pneumoniae*, il peut être soit direct, soit être composé des dipeptides L-alanyl-L-sérine ou L-alanyl-L-alanine, ou encore mettre en jeu une seule L-sérine (Garcia-Bustos *et al.*, 1987). Chez *Staphylococcus aureus*, cinq glycines assurent cette liaison. La partie peptidique du peptidoglycane mature est en général sous la forme d'un tripeptide ou d'un térapeptide.

Bien que la structure du peptidoglycane soit commune à la plupart des bactéries, plus d'une centaine d'hétéropolymères de peptidoglycane chimiquement différents ont pu être dénombrés (Ghuysen, 1968). Cette structure de polymère en réseau rigidifie la cellule.



**Figure 3. Structure chimique du peptidoglycane.** Les chaînes glycanes sont composées d'une alternance de *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et d'acide *N*-acétyl-D-muramique (MurNAc) liés par une liaison glycosidique  $\beta(1-4)$ . La partie peptidique comprend un acide aminé dibasique (L-di-A) en position 3. L'astérisque (\*) représente le pont interpeptidique qui peut être soit direct, soit mettre en jeu des acides aminés branchés et être alors indirect.

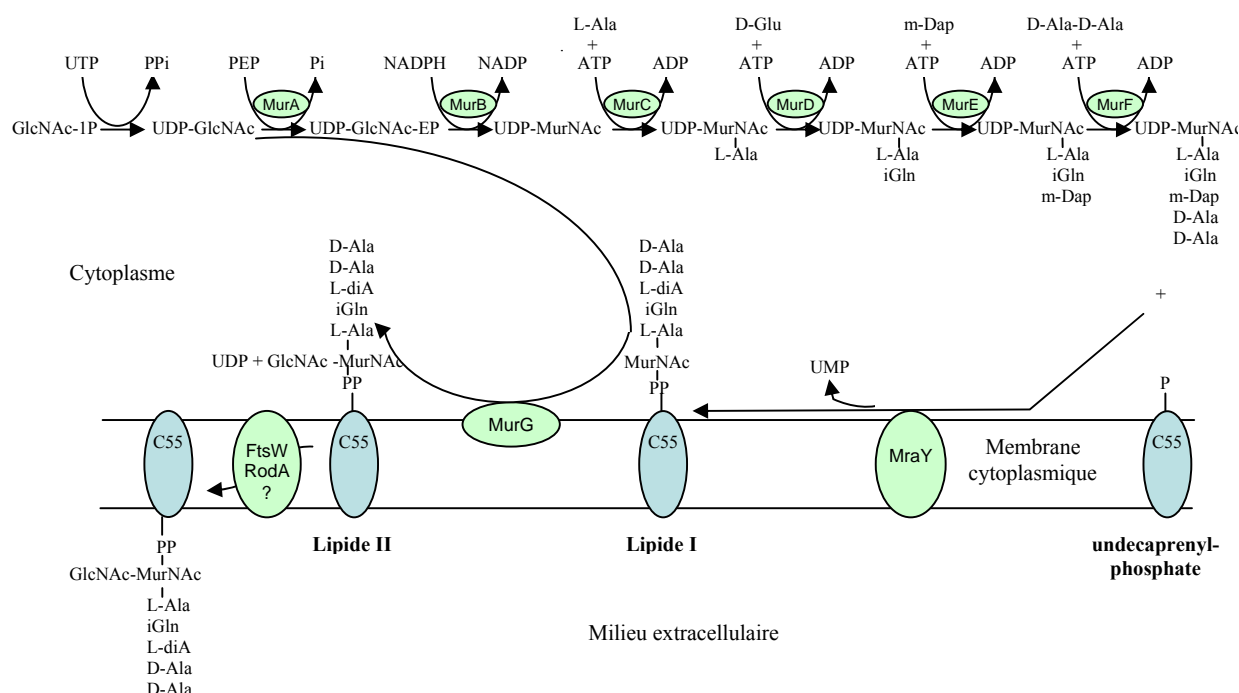
## II. Synthèse du peptidoglycane

La synthèse du peptidoglycane peut être séparée en deux étapes : la formation d'un monomère disaccharide-pentapeptide cytoplasmique qui précède la polymérisation des chaînes glycanes et le pontage transpeptidique localisé du côté externe de la membrane cytoplasmique (Holtje, 1998; van Heijenoort, 2001). Nous prendrons comme modèle *E. coli* pour présenter ces étapes.

## II.1. Formation du précurseur du peptidoglycane, le lipide II, dans le cytoplasme

Chez *E. coli*, les enzymes de la famille Mur (MurA à MurF) catalysent les réactions menant, à partir d'Uridine Di-Phosphate-*N*-acétyl-D-glucosamine (UDP-GlcNAc), à la formation d'UDP-MurNAc auquel est ajouté successivement les cinq acides aminés de la partie peptidique (Fig.4). L'UDP-MurNAc-pentapeptide est ensuite transféré par *MraY* sur un intermédiaire membranaire, l'undécaprényl phosphate (C55-P) pour donner l'undécaprényl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptide, également appelé lipide I. *MurG* additionne au lipide I, l'UDP-GlcNAc sur le résidu MurNAc afin de former le précurseur du peptidoglycane, le lipide II ou undécaprényl-pyrophosphoryl-GlcNAc-MurNAc-pentapeptide.

Le lipide II est ensuite transféré du côté extracellulaire de la membrane plasmique où les étapes finales de synthèse du peptidoglycane seront catalysées. Il a été proposé que les protéines membranaires *FtsW* et *RodA* pourraient jouer le rôle de translocation du lipide II ; à ce jour aucune preuve expérimentale n'a été apportée (Ehlert and Holtje, 1996; Gerard *et al.*, 2002).



**Figure 4. Biosynthèse cytoplasmique des précurseurs du peptidoglycane chez *E. coli*.** Les enzymes de la famille Mur et *MraY* catalysent les réactions menant à la formation du lipide II. La fonction de translocation du lipide II par *FtsW* ou *RodA* reste hypothétique.

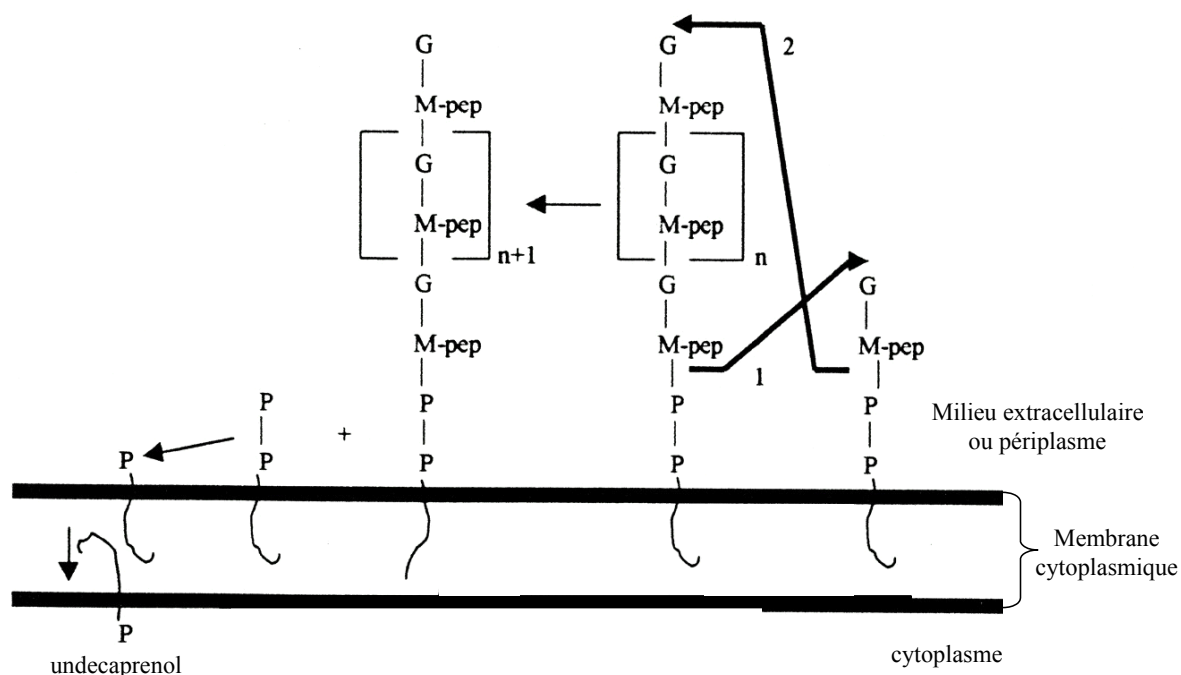
## II.2. Etapes finales extracellulaires de la synthèse du peptidoglycane

Ce sont les PBPs (protéines liant la pénicilline ou « Penicillin-Binding Proteins ») de haut poids moléculaires, présentes dans toutes les bactéries contenant du peptidoglycane, qui catalysent la polymérisation des sucres par une activité glycosyltransférase (GT) et assurent la réticulation des chaînes glycanes par transpeptidation (TP). Ces deux activités sont portées par les domaines extracellulaires des PBPs qui sont des protéines possédant un ancrage membranaire. Les PBPs de classe A possèdent les deux activités alors que les PBPs de classe B ne possèdent que l'activité transpeptidase.

La réaction de glycosyltransférase catalyse le transfert d'un monomère de disaccharide-pentapeptide à l'extrémité d'une chaîne glycane par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique  $\beta(1-4)$ . Le mécanisme exact d'intégration d'un monomère à la chaîne glycane en cours d'élongation par glycosylation n'est pas encore connu. Deux processus sont possibles : la liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  peut se faire soit entre le MurNAc de la chaîne glycane en cours de synthèse et le GlcNAc du lipide II (1) soit entre le MurNAc du lipide II et le GlcNAc du brin glycane (2) (Fig.5) (van Heijenoort, 2001). Dans les deux cas, l'undécaprényle pyrophosphate libéré est alors recyclé. La longueur des chaînes glycanes est variable selon les espèces. Par exemple, chez *E. coli*, elles sont composées pour la grande majorité de 5 et 10 monomères de disaccharides (Harz *et al.*, 1990) tandis que les espèces *B. subtilis* et *Bacillus licheniformis*, la longueur des chaînes glycanes varie entre 96 et 139 unités disaccharidiques (Ward, 1973). Il est à noter que chez *E. coli*, les brins se terminent par une extrémité non réductrice 1,6-anhydro-MurNAc (Harz *et al.*, 1990; Holtje, 1998).

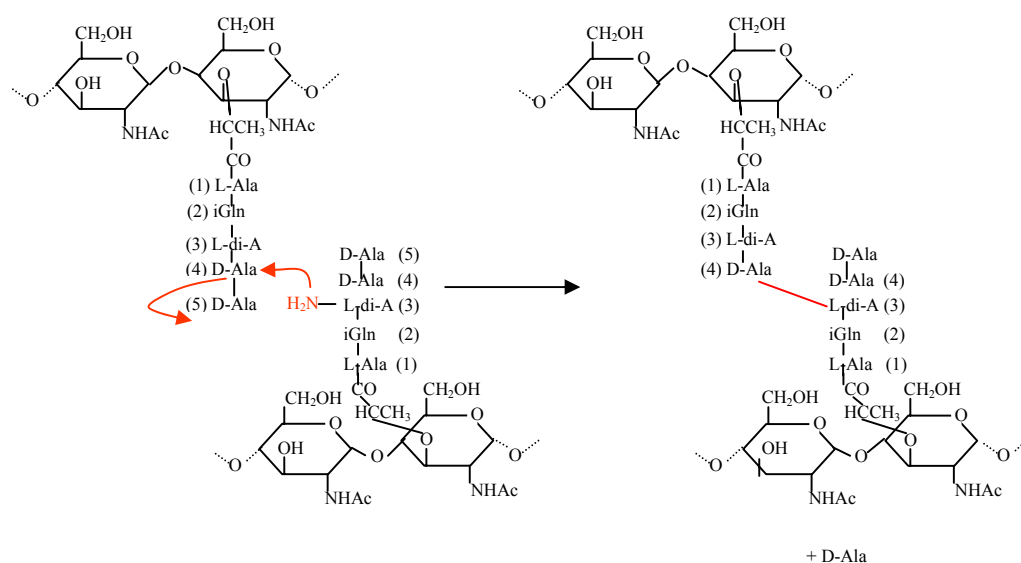
La réaction de glycosyltransférase est inhibée de façon compétitive par la moénomycine, un antibiotique utilisé dans l'alimentation animale. La vancomycine reconnaissant le D-alanyl-D-alanine inhiberait la transglycosylation par effet stérique. Ces deux inhibiteurs sont préférentiellement utilisés pour lutter contre les bactéries à Gram positif, la membrane externe des bactéries à Gram négatif limitant l'entrée de molécules de taille importante.





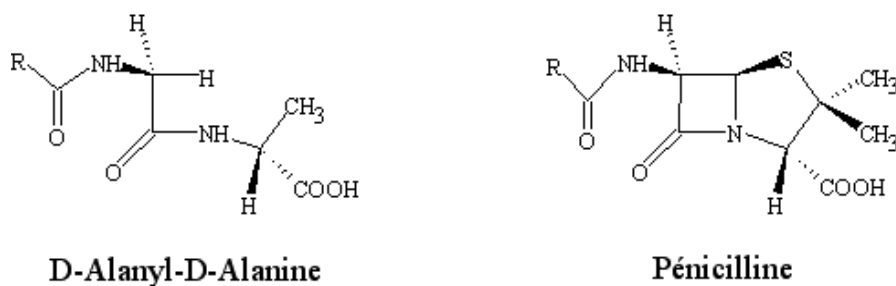
**Figure 5. Elongation des chaînes glycanes par transglycosylation** (d'après van Heijenoort, 2001). La polymérisation des chaînes glycanes est catalysée par les PBPs de classe A. Le transfert d'une chaîne naissante attachée à l'undecaprenol sur le lipide II peut se faire soit sur l'extrémité réductrice (1) soit sur l'extrémité non réductrice (2). G : GlcNAc ; M : MurNAc ; P : undécaprényl phosphate ; P-P : undécaprényl pyrophosphate ; pep : pentapeptide.

La chaîne néoformée est ensuite réticulée aux chaînes adjacentes par l'activité transpeptidase (Fig.6) : les PBPs catalysent la formation de ponts peptidiques entre l'avant-dernier D-alanine (4) d'un peptide donneur et le groupe  $\epsilon$ -aminé porté par l'acide dibasique accepteur. Les PBPs reconnaissent le D-alanyl-D-alanine terminal d'un pentapeptide appelé donneur. Le D-alanine (5) terminal est clivé et libéré en même temps qu'une liaison covalente entre le térapeptide généré et la sérine du site actif du domaine transpeptidase se forme. La réaction de clivage fournit l'énergie nécessaire à la transpeptidation. Le térapeptide est ensuite transféré sur le groupe  $\epsilon$ -aminé de l'acide aminé dibasique (3) du disaccharide-peptide de la chaîne receveuse dans le cas d'un pontage direct.



**Figure 6. Formation d'un pont peptidique direct par transpeptidation.** L'activité transpeptidase est portée par les PBPs de classe A et B.

L'activité transpeptidase est inhibée par les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines qui, par analogie structurale avec le D-alanyl-D-alanine terminal du pentapeptide, se lie de façon covalente à la sérine du site catalytique du domaine transpeptidase des PBPs (Fig.7) (Granier *et al.*, 1994).



**Figure 7. Analogie structurale entre un groupement D-alanyl-D-alanine et une pénicilline.**

Certaines PBPs de faible poids moléculaire assurent la réaction de D,D-carboxypeptidation qui permet de contrôler le degré de réticulation, et donc la flexibilité du peptidoglycane par clivage du D-alanine (5) terminal prévenant ainsi la réaction de transpeptidation par les PBPs de haut poids moléculaire. Cette réaction est également inhibée par les  $\beta$ -lactamines.

### **II.3. Les enzymes de clivage du peptidoglycane sont-elles impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane ?**

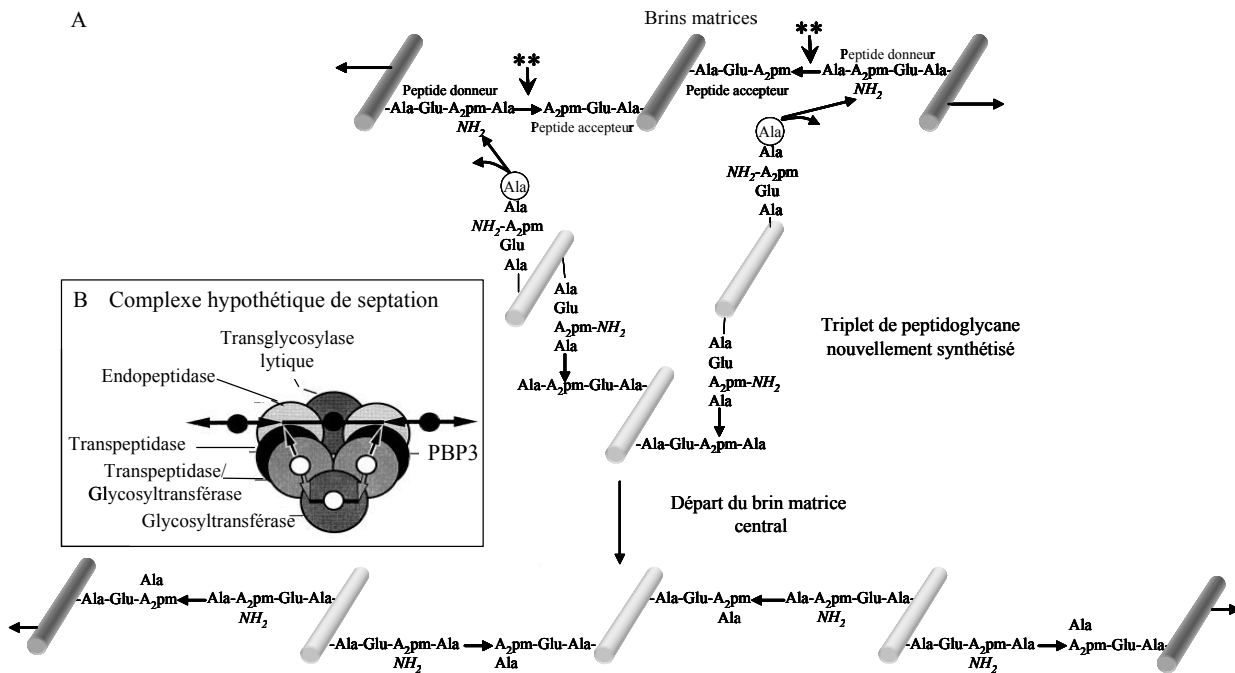
Comme nous venons de le voir, les enzymes intervenant dans la formation du lipide II, précurseur du peptidoglycane et celles permettant la polymérisation et la réticulation des chaînes glycanes sont bien connues. Le processus d'incorporation de chaînes de peptidoglycane néo-synthétisées l'est moins. Nous pouvons cependant supposer que durant cette étape de synthèse, certaines liaisons du peptidoglycane pourraient être clivées afin de permettre l'insertion de nouvelles chaînes. Bien qu'aucune preuve expérimentale n'ait été apportée à ce jour, plusieurs modèles de biosynthèse du peptidoglycane mettant en jeu des hydrolases et des synthétases ont été proposés. Dans cet exposé, le terme hydrolase a été pris au sens large et désigne l'ensemble des enzymes qui clivent le peptidoglycane, faisant intervenir ou non, une molécule d'eau durant leur mécanisme réactionnel.

Dans un premier modèle de synthèse du peptidoglycane, proposé par Park, les hydrolases pourraient intervenir en premier lieu, cliver le peptidoglycane en certains points où les synthétases inséreraient le nouveau matériel (Burman and Park, 1984).

L'hypothèse de Koch appelée « make-before-break », fait intervenir la synthèse de nouveaux brins qui se lieraient de façon covalente par transpeptidation aux chaînes préexistantes situées près de la membrane plasmique, avant que les hydrolases n'agissent pour insérer ce nouveau matériel dans le réseau de peptidoglycane (Koch and Doyle, 1985). Ce modèle de croissance « inside-to-outside », s'accompagnant d'une dégradation du peptidoglycane présent sur les couches les plus externes, a été proposé pour les bactéries à Gram positif en forme de bacille. Il n'est pas envisageable pour les bactéries à Gram négatif qui n'ont probablement qu'une seule couche de peptidoglycane.

Höltje a proposé un modèle de synthèse pour les bactéries à Gram négatif faisant intervenir les enzymes de clivage du peptidoglycane au moment de la synthèse de peptidoglycane septal au cours de la division cellulaire (Fig.8.A.). Ce modèle tient compte de nombreuses données, liées à la croissance et division d'*E. coli*, telles que composition du peptidoglycane en fonction de son âge bio-synthétique, présence de produits de recyclage, élongation diffuse, doublement en taille avant la division (Höltje, 1998). Dans le « modèle 3 pour 1 » trois brins préexistants, un central ponté à deux latéraux, servent de matrice. Trois chaînes glycanes

nouvellement synthétisées et pontées entre elles sont liées par transpeptidation aux amines libres présentes dans les peptides donneurs du brin central de la matrice (Holtje, 1998). Les ponts peptidiques entre le brin central de la matrice et les brins latéraux sont ensuite clivés par des hydrolases spécifiques ; le brin central libéré peut alors être recyclé. Tous les triplets sont insérés successivement au même site pour permettre la formation du septum. La formation d'un complexe mettant en jeu des enzymes de synthèse et dégradation du peptidoglycane permettrait de réguler finement dans le temps et dans l'espace l'action de ces deux types d'enzymes. En accord avec son modèle « 3 pour 1 », Hölte propose l'existence d'un complexe impliqué dans la septation du peptidoglycane. Ce complexe mettrait en jeu un dimère de PBP de classe A bifonctionnelle, un dimère de PBP de classe B monofonctionnel, une transglycosylase lytique, un dimère d'endopeptidase et une glycosyltransférase monofonctionnelle (Fig.8.B.) (Holtje, 1998). Les dimères de PBPs et la glycosyltransférase monofonctionnelle participeraient respectivement à la synthèse des brins latéraux et du brin central du triplet de peptidoglycane nouvellement synthétisé. Les activités transglycosylase lytique et endopeptidase seront présentées au paragraphe I de la partie « Les hydrolases du peptidoglycane ». Une étude d'interaction protéine-protéine réalisée par chromatographie d'affinité a montré que la formation de tels complexes était possible chez *E. coli*. Les transglycosylases lytiques Slt70, MltB et MltA immobilisées sur colonne retenaient, entre autre, les PBPs bifonctionnelles PBP1A, PBP1B et PBP1C, les transpeptidases PBP2 et PBP3 ainsi que les endopeptidases PBP4 et PBP7/8, PBP8 étant le produit de dégradation de PBP7 (Holtje, 1995; Romeis and Holtje, 1994; Vollmer *et al.*, 1999; von Rechenberg *et al.*, 1996). Ainsi, l'interaction de la transglycosylase lytique Slt70 avec PBP3 spécifiquement impliquée dans la formation du septum et avec la D,D-endopeptidase PBP7/8 a été mise en évidence (Romeis and Holtje, 1994). Il a également été montré par résonance plasmonique de surface (BIAcore) que la polymérase de classe A, PBP1B, interagirait avec la transglycosylase lytique MltA par l'intermédiaire de la protéine MipA dont le rôle serait justement de coupler ces deux enzymes (Vollmer *et al.*, 1999).



**Figure 8. Modèle de synthèse de peptidoglycane septal « 3 pour 1 »** (d'après Holtje, 1998).

A : Le triplet de peptidoglycane nouvellement synthétisé en blanc est attaché covalentement aux groupes aminés libres des peptides donneurs qui sont disposés de part et d'autre du brin matrice central. Des clivages spécifiques (\*\*) des ponts peptidiques des brins matrices entraînent le remplacement du brin matrice central par le triplet de peptidoglycane nouvellement synthétisé.

B : complexe hypothétique de synthèse septale du peptidoglycane. Le triplet de peptidoglycane est synthétisé par les activités transpeptidase et glycosyltransférase. L'insertion du triplet est réalisée par les activités endopeptidase et transglycosylase lytique. Les grands cercles, les petits cercles noirs et les petits cercles blancs représentent respectivement les enzymes, les chaînes glycanes existantes et les brins glycanes nouvellement synthétisés. Les flèches et les traits représentent respectivement les peptides donneurs et accepteurs.

Höltje propose un mécanisme alternatif pour l'élongation cellulaire qui ne ferait pas intervenir d'hydrolases. En effet, chez *E. coli*, des souches dont plusieurs gènes codant pour des hydrolases ont été inactivés sont toujours viables. Elles forment de longues chaînes et présentent un temps de génération proche de celui de la souche de type sauvage (Heidrich *et al.*, 2002). Höltje fait donc l'hypothèse que, durant l'élongation, des transférases assureraient le clivage des liaisons des anciens brins de peptidoglycane, tout en insérant en même temps le nouveau matériel (Höltje and Heidrich, 2001).

Ces modèles reposent sur un arrangement des chaînes glycanes parallèle à la membrane cytoplasmique (Holtje, 1998). A ce jour, il n'existe aucune preuve expérimentale quant à l'organisation tridimensionnelle de l'hétéropolymère de peptidoglycane. Une autre théorie, reposant sur des simulations informatiques tenant compte des propriétés bio-physique du peptidoglycane telles que longueur des chaînes glycanes, degré de réticulation, taille des pores, différences entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif, suggère que les chaînes glycanes soient orientées perpendiculairement à la membrane cytoplasmique (Dmitriev *et al.*, 2003). Ce modèle « scaffold » (échafaudage) propose que la biosynthèse du peptidoglycane procède par un assemblage séquentiel des chaînes glycanes néo-synthétisées à l'hétéropolymère pré-existant.

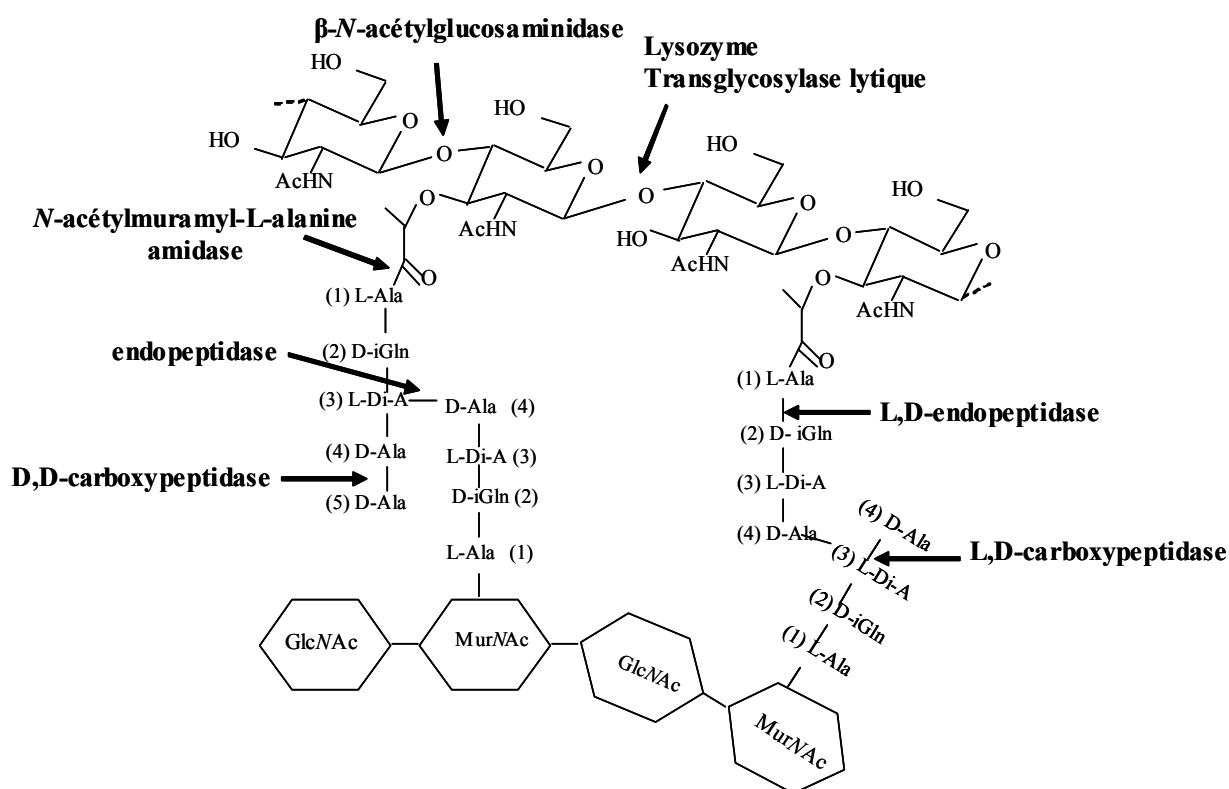
#### **IV. Intérêt de l'étude des hydrolases du peptidoglycane**

Le métabolisme du peptidoglycane est un processus dynamique qui doit être hautement contrôlé durant l'élongation et la division cellulaire. De plus, le peptidoglycane subit des étapes de maturation et de dégradation. Il peut aussi être recyclé chez certaines bactéries à Gram négatif. Durant les processus de virulence et de conjugaison de certaines bactéries à Gram négatif, le remodelage du peptidoglycane est indispensable pour permettre l'insertion de complexes membranaires de sécrétion. Toutes ces modifications de structure de cet hétéropolymère nécessitent l'action d'enzymes de clivage du peptidoglycane ou hydrolases. Ces enzymes clivent spécifiquement presque toutes les liaisons glycosidiques, amides et peptidiques du peptidoglycane. Nous nous sommes donc intéressés à ces différentes enzymes, aux types de liaisons qu'elles clivent et à leur produit de réaction avant de détailler leur fonction dans divers processus cellulaires.

## Les hydrolases du peptidoglycane

### I. Les différentes enzymes de clivage du peptidoglycane

Alexander Fleming identifia la première enzyme capable de dégrader le peptidoglycane et de causer la lyse de la bactérie. Pour cette raison, elle fut appelée lysozyme. Les liaisons chimiques, entre les sucres et au sein du peptide, constituent des substrats pour les enzymes de clivage du peptidoglycane (Fig.9).



**Figure 9. Spécificités des hydrolases du peptidoglycane.** La liaison clivée par les enzymes est indiquée par les flèches

## I.1. Clivage des liaisons glycosidiques

Le clivage des liaisons de la chaîne glycane peut être effectué par trois enzymes différentes.

### a. $\beta$ -N-acétylglucosaminidases

Les  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases (glucosaminidases) clivent la liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  entre les résidus GlcNAc et MurNAc du peptidoglycane libérant un groupe GlcNAc avec une extrémité réductrice (Fig.9) (Karamanos, 1997). Il existe des endo- $\beta$ -N-acétylglucosaminidases, comme par exemple l'autolysine modulaire Atl de *S. aureus* qui hydrolysent toutes les liaisons glycosidiques  $\beta(1-4)$  entre les résidus GlcNAc et MurNAc à l'exception des liaisons terminales (Oshida *et al.*, 1995). La glucosaminidase cytoplasmique NagZ identifiée chez *E. coli* est une enzyme cytoplasmique qui agit sur les produits solubles de dégradation du peptidoglycane (Yem and Wu, 1976 ; Votsch and Templin, 2000). Durant le processus de recyclage, cette glucosaminidase permettrait la formation de monosaccharides à partir de mucopeptides GlcNAc-1,6-anhydroMurNAc-peptides. *B. subtilis* possède également une glucosaminidase avec une activité de type exo, LytG qui pourrait avoir un rôle dans la motilité de flagelles durant la croissance végétative (Horsburgh *et al.*, 2003).

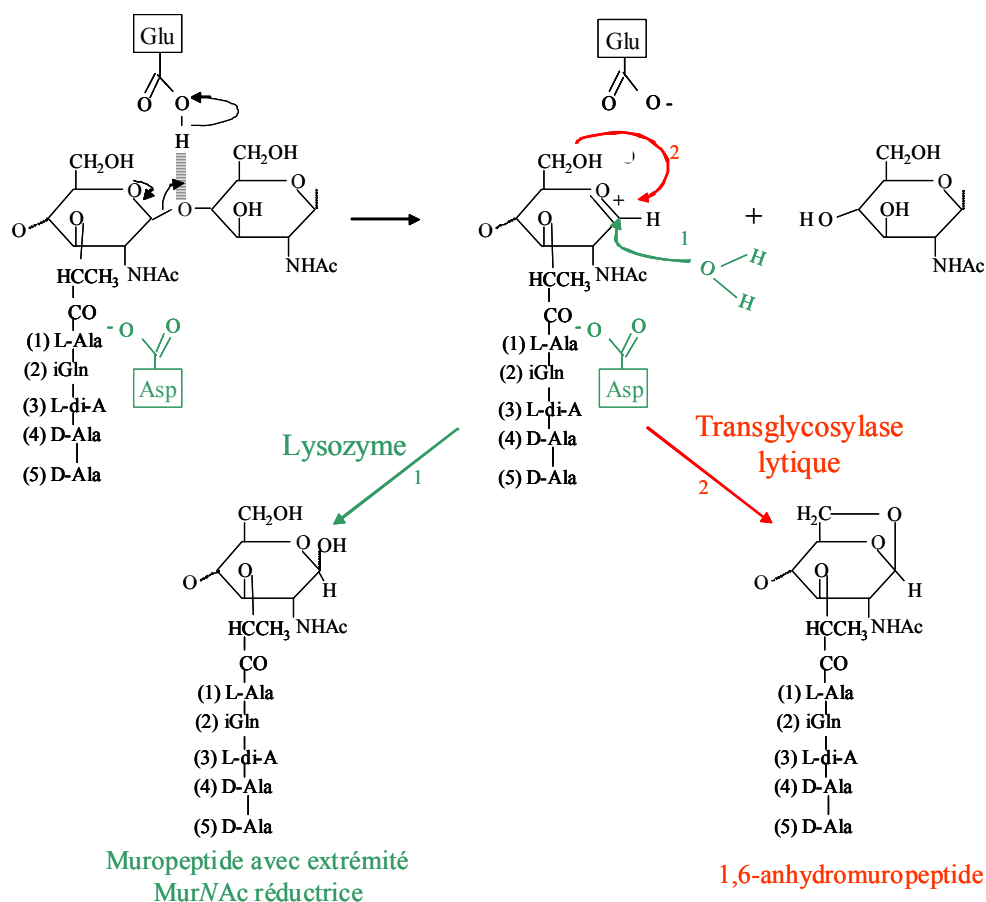
### b. Lysozymes et transglycosylases lytiques

Les lysozymes ou endo- $\beta$ -N-acétylmuramidases hydrolysent la liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  entre les résidus MurNAc et GlcNAc du peptidoglycane (Fig.9). Le produit résultant de l'action du lysozyme est un mucopeptide ayant une extrémité MurNAc réductrice. Cette réaction met en jeu deux acides aminés catalytiques : un acide glutamique donneur et un aspartate jouant le rôle de base (Fig.10) (Strynadka and James, 1996). Chez *E. coli*, cette activité n'a pas été identifiée.

Tout comme le lysozyme, les transglycosylases lytiques clivent la liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  entre les résidus MurNAc et GlcNAc du peptidoglycane (Fig.9). Le produit résultant de leur activité porte une extrémité non réductrice 1,6-anhydro sur MurNAc (Fig.10) (Holtje, 1995).

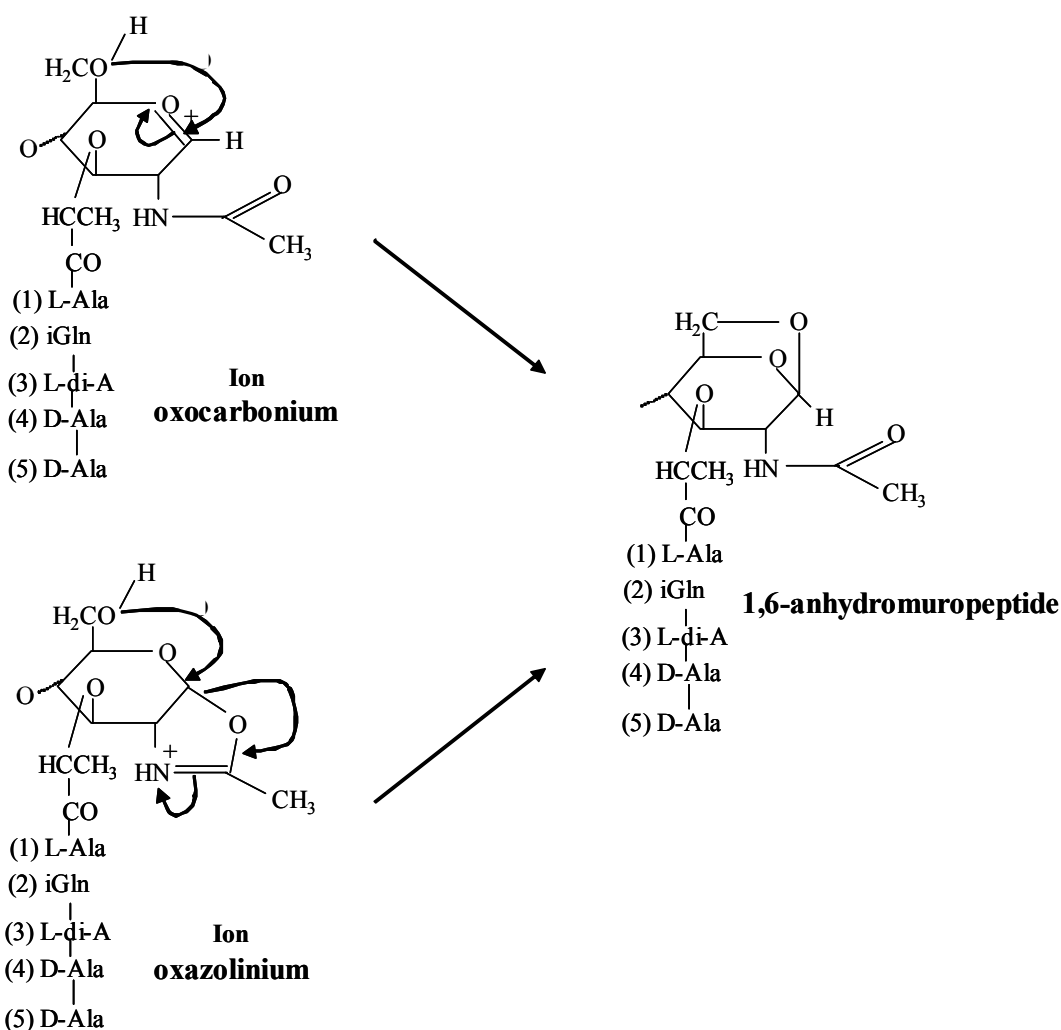


Les transglycosylases lytiques sont les seules enzymes de clivage du peptidoglycane dont la réaction ne met pas en jeu une molécule d'eau. Au sens strict du terme, ce ne sont donc pas des hydrolases.



**Figure 10. Comparaison des mécanismes catalytiques des activités lysozyme et transglycosylase lytique.** La première étape consiste en un clivage de la liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  entre les résidus MurNAc et GlcNAc du peptidoglycane. Dans le cas du lysozyme, l'ion oxocarbenium est stabilisé par la charge négative de l'aspartate (en vert). Une molécule d'eau attaque l'intermédiaire chargé positivement (1). Le mécanisme réactionnel de la transglycosylase lytique, reposant sur une attaque intramoléculaire de l'oxygène, porté sur le carbone C6, sur le carbone C1, conduit à la formation d'une liaison 1,6-anhydro (en rouge) (2).

Les transglycosylases lytiques procèdent par réaction intramoléculaire avec passage par un intermédiaire ion oxocarbenium pour Slt70 d'*E. coli*, ou oxazolinium mis en évidence pour MltB d'*E. coli* (Fig.11) (Reid *et al.*, 2004; Thunnissen *et al.*, 1995; van Asselt *et al.*, 2000).



**Figure 11. Intermédiaires potentiels réactionnels de la réaction des transglycosylases lytiques.** L'ion oxocarbonium et l'ion oxazolinium seraient respectivement l'intermédiaire réactionnel de Slt70 et de MltB d'*E. coli*. Dans les deux cas, la réaction de transglycosylation lytique conduit à la formation du même produit 1,6-anhydromuropeptide.

L'activité transglycosylase lytique a été identifiée uniquement chez les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif sporulant comme par exemple *B. subtilis* (Atrih *et al.*, 1998). La présence d'extrémités non réductrices 1,6-anhydro-MurNAc sur les brins de peptidoglycane d'*E. coli* est une preuve indirecte de leur implication dans la synthèse de peptidoglycane (Harz *et al.*, 1990; Holtje, 1998). *E. coli* possède six transglycosylases lytiques qui ont été particulièrement bien étudiées : cinq d'entre elles sont des lipoprotéines liées à la membrane externe MltA, MltB, MltC, MltD, et EmtA (ou MltE), et une soluble Slt70

principalement localisée dans le périplasme (Walderich and Holtje, 1991). MltA, MltB, MltD et, Slt70 agiraient comme des exo-enzymes en commençant par l'extrémité non réductrice GlcNAc des chaînes glycanes alors que MltC et EmtA seraient des endo-enzymes (Dijkstra and Keck, 1996; Ehlert *et al.*, 1995; Kraft *et al.*, 1998; Templin *et al.*, 1992; Ursinus and Holtje, 1994). Des analyses de séquences en acides aminés ont permis de séparer en quatre familles les transglycosylases lytiques (Blackburn and Clarke, 2001). Slt70, MltC, MltD, et EmtA se trouvent dans la première famille où trois motifs conservés ont été mis en évidence (Tableau 1) : ES dont le glutamate est le résidu catalytique, GLMQ et AYNxG, deux motifs participant à la liaison au peptidoglycane (Koonin and Rudd, 1994). Les transglycosylases lytiques de ce groupe se trouvent inhibées par la bulgecine, inhibiteur qui agit comme un analogue de l'ion intermédiaire oxocarbonium (Dijkstra and Keck, 1996; Templin *et al.*, 1992; Thunnissen *et al.*, 1995). MltA se trouve dans le second groupe de transglycosylases lytiques qui possèdent pour résidus catalytiques non pas un glutamate mais trois résidus aspartates (Tableau 1) (Blackburn and Clarke, 2001; van Straaten *et al.*, 2005). Pour finir, MltB se trouve dans le troisième groupe des transglycosylases lytiques et présente en plus d'un cœur catalytique structuré comme Slt70, un domaine de liaison au calcium de type « EF-hand », stabilisant l'enzyme (Tableau 1) (Blackburn and Clarke, 2001; van Asselt *et al.*, 1999; van Asselt and Dijkstra, 1999; van Asselt *et al.*, 2000). Ceci pourrait expliquer, lors de la réaction, le passage par un intermédiaire différent de celui de Slt70. Aucune transglycosylase lytique d'*E. coli* ne fait partie de la quatrième famille qui est essentiellement composée d'enzymes issues de bactériophages.

Transglycosylases lytiques d' <i>E. coli</i>	Caractéristiques
Famille I : Slt70, MltC, MltD et EmtA	Motifs catalytiques et de liaison au peptidoglycane : [ES], [GLMQ] et [AYNxG]
Famille II : MltA	Trois résidus aspartates catalytiques
Famille III : MltB	Motif catalytique : [ET] + Domaine de liaison au calcium de type « EF-hand »
Famille IV	Motifs catalytiques et de liaison au peptidoglycane : [SE], [Y(4x)G(5x)DxSxHP], [ST(4x)GRYQ(5x)W]

**Tableau 1. Répartition des transglycosylases lytiques d'*E. coli* selon la classification de Blackburn et Clarke. D'après (Blackburn and Clarke, 2001).**

## **I.2. Clivage de la liaison amide entre MurNAc et la partie peptidique du peptidoglycane**

Les *N*-acétylmuramyl-L-alanine amidases (amidases) clivent la liaison amide entre le groupement carbonyle de l'acide lactique de MurNAc et l'acide aminé L-alanine (1) de la partie peptidique du peptidoglycane (Fig.9). Certaines amidases ont pour substrat l'hétéropolymère de peptidoglycane alors que d'autres agiraient préférentiellement sur les mucopeptides comme l'amidase périplasmique d'*E. coli*, AmiA (Holtje, 1995 ; Parquet *et al.*, 1983). Certaines peuvent avoir une spécificité pour le groupement 1,6-anhydro présent sur MurNAc à l'extrémité des chaînes glycanes et sur certains produits de dégradation issus de la réaction de transglycosylase lytique. Par exemple, l'amidase d'*E.coli*, AmpD, est une hydrolase cytoplasmique qui clive spécifiquement la liaison amide entre un résidu 1,6-anhydro-MurNAc et l'acide aminé L-alanine (1) d'un produit 1,6-anhydro-MurNAc-tripeptide (Holtje, 1995; Jacobs *et al.*, 1995).

## **I.3. Clivage des liaisons peptidiques**

Les peptidases clivent les liaisons peptidiques du peptidoglycane présentes dans le pentapeptide ou le pont interpeptidique. Ces enzymes sont classés en fonction de la nature des liaisons clivées entre deux acides aminés qui peuvent être tous deux de série D ou un de configuration L et un de configuration D. De plus, ces enzymes peuvent encore être séparées en deux catégories : les exopeptidases ou carboxypeptidases clivent les liaisons peptidiques terminales et les endopeptidases hydrolysant les liaisons peptidiques internes (Fig.9).

### *a. Carboxypeptidases*

Il existe deux sortes de carboxypeptidases identifiées, les D,D-carboxypeptidases et les L,D-carboxypeptidases. Les D,D-carboxypeptidases sont des PBPs de faible poids moléculaire qui clivent la liaison peptidique entre les deux derniers acides aminés D-Alanines du pentapeptide (Fig.9). Ces enzymes présentent les trois motifs conservés du domaine transpeptidase des PBPs, à savoir SXXK, SXN et K[T/S]G. Contrairement aux D,D-carboxypeptidases, les L,D-

carboxypeptidases sont sensibles à un spectre plus restreint de  $\beta$ -lactamines. Ces enzymes clivent la liaison peptidique entre l'acide *méso*-diaminopimélique (3) ou L-lysine (3) et le D-alanine (4) d'un résidu muro-tétrapeptide pour donner un résidu muro-tripeptide (Fig.9). La structure tridimensionnelle d'une L,D-carboxypeptidase chez *Pseudomonas aeruginosa* met en évidence trois résidus catalytiques : une sérine, une histidine et un glutamate (Korza and Bochtler, 2005). Leur activité est stimulée par des cations divalents comme le magnésium et le calcium mais pas le zinc.

### *b. Endopeptidases*

Des endopeptidases devraient exister pour chaque liaison peptidique interne. Ces enzymes sont généralement des métallopeptidases faisant intervenir le plus souvent un atome de zinc. Chez *Bacillus sphaericus* trois résidus liant un atome de zinc, deux histidines et un glutamate et deux résidus catalytiques, une tyrosine et un glutamate ont été mis en évidence dans la peptidase I qui clive la liaison entre l'acide aminé D-glutamate (2) et l'acide L-*méso*-diaminopimélique (3) (Hourdou *et al.*, 1993). Un exemple d'endopeptidase contenant le domaine catalytique NlpD/peptidase M37 est la lysostaphine de *Staphylococcus simulans*. Cette métalloprotéine à zinc hydrolyse le pont polyglycine interpeptidique des espèces staphylococcales (Recsei *et al.*, 1987).

Des protéines, principalement chez les bactéries à Gram positif, comportant un domaine CHAP (Cystéine, Histidine-dépendent amidohydrolase/peptidase) ou NlpC/P60 ont été rapportées comme étant des endopeptidases. Le domaine NlpC/P60 et le domaine CHAP sont identiques (Rigden *et al.*, 2003). La liaison exacte hydrolysée par ce domaine n'a cependant pas été caractérisée. Cette famille de protéines comporte trois résidus conservés supposés participer à la catalyse de la réaction : une cystéine, une histidine et un résidu polaire, souvent l'acide aspartique. Ces enzymes hydrolyseraient des substrats spécifiques qui contiennent une D-isoglutamine ou un D-glutamate (2) (Anantharaman and Aravind, 2003; Bateman and Rawlings, 2003; Rigden *et al.*, 2003). Ainsi, la liaison entre les acides aminés D-isoglutamine ou D-glutamate (2) et acide *méso*-diaminopimélique (3) ou L-lysine (3) pourrait être clivée par ces endopeptidases.

## II. Caractérisation enzymatique de l'activité de clivage du peptidoglycane

L'hétéropolymère de peptidoglycane est une macromolécule insoluble alors que les fragments de mucopeptides issus de son clivage sont solubles. Cette propriété est à la base de toutes les méthodes utilisées pour mettre en évidence l'activité des hydrolases.

### II.1. Méthodes permettant de détecter une activité hydrolytique

Une des deux techniques les plus couramment utilisées pour démontrer une activité de dégradation du peptidoglycane est le zymogramme (Leclerc and Asselin, 1989). Du peptidoglycane insoluble ou des cellules lyophilisées de *Micrococcus lysodeikticus* sont incorporés dans un gel de polyacrylamide qui sert de support à une analyse des enzymes. L'électrophorèse du gel d'aspect turbide et blanchâtre est réalisée en conditions dénaturantes. Une étape de renaturation de la protéine permet alors à l'enzyme de retrouver toute ou partie de son activité. Si l'hydrolyse du peptidoglycane survient, la zone du gel correspondant à la migration de la protéine devient plus claire signe que le peptidoglycane a été solubilisé. Cette technique est également utilisée avec des extraits cellulaires totaux afin de dénombrer, et le cas échéant, d'identifier les hydrolases d'une espèce bactérienne (Bernadsky *et al.*, 1994; Leclerc and Asselin, 1989; Sugai *et al.*, 1990). L'implication d'hydrolases à différents moments de croissances ou durant des processus particuliers tels que la sporulation chez *B. subtilis* est possible (Foster, 1992).

La seconde technique classiquement utilisée consiste à mesurer la présence de radioactivité dans des mucopeptides solubilisés par l'action d'une enzyme donnée sur le polymère de peptidoglycane préalablement marqué radioactivement (Engel *et al.*, 1991). Le polymère de peptidoglycane peut par exemple être marqué par l'incorporation d'acide <sup>3</sup>H-meso-diaminopimélique à partir d'une souche d'*E.coli* auxotrophe mutée sur le gène *dap* empêchant la synthèse d'acide meso-diaminopimélique endogène (Ursinus and Holtje, 1994; Wientjes *et al.*, 1985).

Ces procédés permettent de mettre en évidence la fonction d'hydrolyse du peptidoglycane d'une enzyme mais ne donnent pas d'information quant à la nature de la liaison clivée.

## II.2. Analyse de mucopeptides

L'analyse de mucopeptides issus de la digestion de l'hétéropolymère de peptidoglycane par une muramidase est basée sur leur séparation par chromatographie liquide à haute pression en phase inverse (RP-HPLC) (Glauner, 1988) puis de leur identification par détermination de la composition en acides aminés (Glauner *et al.*, 1988). L'identification peut aussi se faire par spectrométrie de masse. Une étape supplémentaire de fragmentation du mucopeptide par PSD (Postsource Decay Analysis), ou une étude complémentaire par spectrométrie de masse en tandem peut contribuer à une meilleure caractérisation de la partie peptidique des mucopeptides (Arbeloa *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 1997). Cette approche permet non seulement de remonter à l'activité enzymatique d'une enzyme donnée mais aussi d'analyser la composition globale du peptidoglycane d'une souche.

Le peptidoglycane servant de substrat, l'activité enzymatique des hydrolases est déduite de la caractérisation précise des produits de réaction. Une comparaison du profil RP-HPLC obtenu après séparation des mucopeptides avec le profil RP-HPLC d'une enzyme dont l'activité est connue permet de supprimer l'étape de spectrométrie de masse (Engel *et al.*, 1992).

Ces techniques de RP-HPLC et de spectrométrie de masse ont également permis de réaliser des études de la composition globale du peptidoglycane de certaines espèces (Garcia-Bustos *et al.*, 1987; Harz *et al.*, 1990), de faire des comparaisons entre différentes souches dans le cadre de la résistance aux antibiotiques par exemple (Boneca *et al.*, 1997; de Jonge *et al.*, 1992; Garcia-Bustos and Dougherty, 1987) ainsi que d'étudier certains changements constatés pendant des phénomènes comme la sporulation (Atrih *et al.*, 1998; Atrih and Foster, 2001; Chirakkal *et al.*, 2002).

## III. Fonctions associées aux enzymes de clivage du peptidoglycane

Face à la diversité des hydrolases du peptidoglycane, nous pouvons nous demander quelles fonctions particulières ces enzymes peuvent avoir au cours de la vie bactérienne. L'autolyse, la séparation des cellules filles au cours de la division, ou encore la virulence, le recyclage des mucopeptides et l'induction des  $\beta$ -lactamases, la sporulation, la sécrétion de

transporteurs macromoléculaires, et la formation de flagelles sont des événements qui nécessitent l'intervention des diverses hydrolases du peptidoglycane.

### III.1. Autolyse

Toutes les hydrolases ne sont pas des autolysines, seules certaines sont responsables de la lyse dans des conditions particulières. Certaines bactéries possèdent la propriété de lyser spontanément lorsqu'elles atteignent la phase stationnaire. Les enzymes autolytiques rapportées ici sont celles qui induisent la lyse lorsqu'elles sont surexprimées. De plus, nous considérons également qu'une souche possédant une autolysine inactivée montrera une lyse réduite par rapport à la souche de type sauvage. Dans ce paragraphe ne seront pas pris en compte les phénomènes de lyse dans des conditions de croissance particulières tels que sporulation (développée au paragraphe III.5.), ou de bactériolyse due à l'action des  $\beta$ -lactamines.

La glucosaminidase, AcmA, de *Lactococcus lactis* est responsable de la lyse en phase stationnaire (Buist *et al.*, 1995; Ouzari *et al.*, 2002; Steen *et al.*, 2005) car une souche délétée du gène correspondant ne lyse plus. De même, chez *B. subtilis*, en comparaison à une souche de type sauvage, l'inactivation du gène *lytE* codant pour une endopeptidase conduit à une réduction de l'autolyse de la souche mutée (Margot *et al.*, 1998). Chez cette bactérie, l'endo-glucosaminidase LytD et l'amidase LytC seraient également des autolysines (Blackman *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2003). Une souche de *N. gonorrhoeae* mutée au niveau du gène *atla* ou du gène *ltgA*, codant pour des transglycosylases lytiques, présente une inhibition de sa lyse en phase stationnaire (Cloud and Dillard, 2002; Dillard and Seifert, 1997). Chez *E. coli*, la surexpression de MltB et MltD conduit à la lyse cellulaire ce qui pourrait indiquer un rôle de ces transglycosylases lytiques dans l'autolyse (Dijkstra *et al.*, 1995; Ehlert *et al.*, 1995).

Ces exemples montrent que l'action de différentes hydrolases peut conduire à l'autolyse : des amidases, des glucosaminidases, des transglycosylases lytiques et des endopeptidases. L'autolyse jouerait un rôle dans la communication intercellulaire et favoriserait une réponse adaptative de la population bactérienne en fonction de son environnement.



### III.2. Croissance bactérienne et division cellulaire

La division cellulaire, fonction vitale bactérienne, met en jeu, entre autres processus, la synthèse du peptidoglycane septal par les PBPs. Le rôle des hydrolases dans la division bactérienne n'est étudié que depuis peu de temps. En effet, face à l'accroissement de la résistance aux antibiotiques, l'étude du métabolisme du peptidoglycane s'est développée, l'objectif étant de tenter d'identifier des cibles thérapeutiques alternatives aux PBPs. L'étude des hydrolases au cours de la division consiste principalement à déterminer leur localisation au cours du cycle cellulaire et à analyser la morphologie de souches mutées. Des exemples ont été pris chez des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, de formes cylindriques et de morphologie coccoïdale.

De longues chaînes indiquant que les cellules filles ne se sont pas séparées après division ont été observées chez les souches dont les gènes suivants ont été inactivés : gène de la glucosaminidase *AcmA* de *L. lactis* (Buist *et al.*, 1995), les gènes des endopeptidases possédant des domaines CHAP-NlpC/P60, P60 de *Listeria monocytogenes* (Fig.12.A) (Anantharaman and Aravind, 2003; Kuhn and Goebel, 1989), *CwlF* de *B. subtilis* (Ishikawa *et al.*, 1998) ainsi que les gènes des deux endopeptidases *LytE* et *LytF* de *B. subtilis* (Yamamoto *et al.*, 2003). Dans ce dernier cas, il a été montré par immunolocalisation que les protéines *LytE* et *LytF* se localisent aux sites de septation et aux pôles de la cellule (Yamamoto *et al.*, 2003).

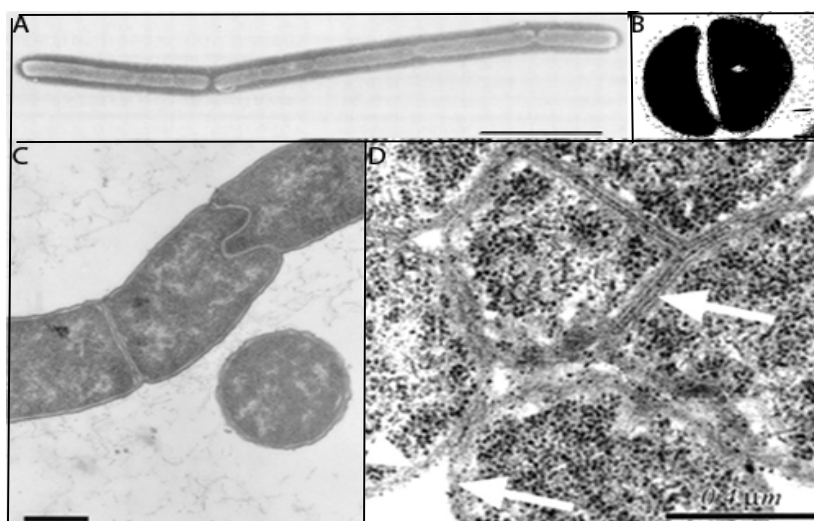
La croissance d'*E. coli* ne semble pas être perturbée par l'absence simultanée des transglycosylases lytiques *Slt70*, *MltA* et *MltB*, des trois endopeptidases *MepA*, *PBP4* et *PBP7* ou des deux carboxypeptidases *PBP5* et *PBP6* (Heidrich *et al.*, 2002; Holtje and Tuomanen, 1991; Lommatzsch *et al.*, 1997). Cependant, un mutant du gène codant pour l'amidase *AmiA*, ou des gènes des six transglycosylases lytiques présente un phénotype de chaînes. La longueur des chaînes du mutant *amiA* augmente avec l'inactivation supplémentaire des autres amidases *AmiB* et *AmiC* ainsi qu'avec les trois endopeptidases *MepA*, *PBP4* et *PBP7* (Heidrich *et al.*, 2001; Heidrich *et al.*, 2002). La localisation septale de *AmiC* dans les cellules en constriction uniquement a confirmé son rôle dans la division (Bernhardt and de Boer, 2003). Ainsi, chez *E. coli*, les amidases jouent un rôle prédominant dans la séparation des cellules filles qui implique également des transglycosylases lytiques et des endopeptidases. Les D,D-carboxypeptidases, *PBP5* et *PBP6* joueraient également un rôle dans la morphologie cellulaire et dans la division

cellulaire (Santos *et al.*, 2002). Un phénotype intéressant d'aberrations morphologiques est la présence de cellules branchées en forme de Y ou de X pour une souche dont le gène codant pour la D,D-carboxypeptidase PBP5 a été inactivé et dont la division cellulaire a été bloquée (de Pedro *et al.*, 2003). Ces branchements sont la conséquence d'une perturbation locale du peptidoglycane. Pour les cellules de type sauvage, les pôles sont inertes et le métabolisme du peptidoglycane en ces zones est très fortement réduit. Les branchements résulteraient potentiellement d'une synthèse active déclenchée au niveau des zones polaires ou en des régions aberrantes. Il a été proposé que PBP5 pourrait favoriser la reconnaissance des zones où le néo-peptidoglycane doit être inséré.

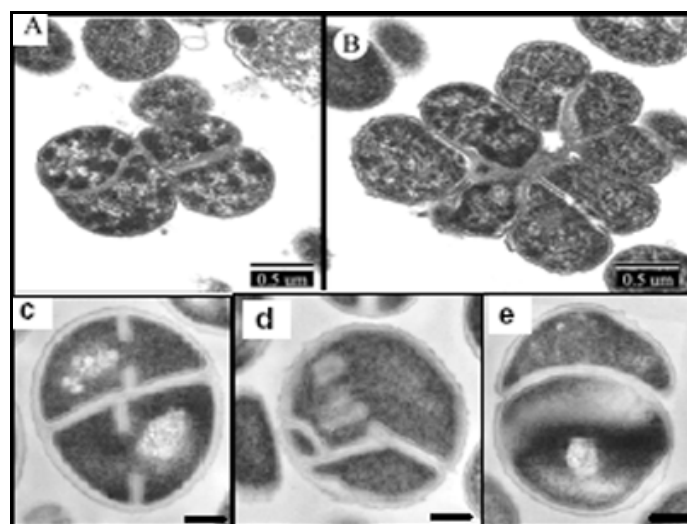
Une souche de *Neisseria meningitidis* dont la transglycosylase lytique GNA33 a été inactivée forme des groupes de cellules présentant une membrane externe continue (Adu-Bobie *et al.*, 2004). De même, des groupes de cellules se forment suite à l'inactivation du gène codant pour l'autolysine modulaire Atl chez le coque *S. aureus* (Fig.12.B.) (Takahashi *et al.*, 2002). Les deux domaines enzymatiques amidase et glucosaminidase de Atl se localisent d'ailleurs au site de septation en cours ainsi qu'aux futurs sites de division (Oshida *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1996).

Ces exemples illustrent l'implication d'hydrolases dans la séparation des cellules filles, étape ultime de la division cellulaire. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 12, reprenant quelques exemples cités ci-dessus, le septum est présent et bien formé. Seule la souche d'*E. coli* mutée au niveau de sept hydrolases montre 1 à 5% de septa sinueux uniquement membranaires (membrane cytoplasmique) (Fig.12.C). Dans le cas de *N. meningitidis*, non pas de longues chaînes, mais des groupes de cellules sont observés dus à la présence de la membrane externe et à l'absence de séparation chez ce coque à Gram négatif (Fig.12.D).

Des aberrations de septation associées à la séparation des cellules filles indiquent un rôle à un stade plus précoce dans la division (Fig.13). C'est le cas pour une souche de *N. gonorrhoeae* : l'inactivation de la transglycosylase lytique, LtgC, conduit à la formation de septa anormaux et à la non séparation des cellules (Fig.13.A. et B.) (Cloud and Dillard, 2004). De même, chez *S. aureus*, un mutant de l'amidase Sle1 présente des cellules plus volumineuses contenant plusieurs septa dans différents plans (Fig.13.C. à E.) (Kajimura *et al.*, 2005). Les cellules ne se séparent plus et forment des groupes.



**Figure 12. Implication des hydrolases dans la séparation des cellules filles.** Observations en microscopie électronique à transmission. A. Souche de *L. monocytogenes* déletée de l'endopeptidase P60, (échelle : 1  $\mu$ m) (Kuhn and Goebel, 1989). B. Souche de *S. aureus* dont le gène *atl* est muté, (échelle : 0,1  $\mu$ m) (Takahashi *et al.*, 2002). C. Coupe d'une souche d'*E. coli* mutée au niveau des gènes codant pour la transglycosylase lytique Slt70, les amidases AmiA, AmiB et AmiC ainsi que les endopeptidases MepA, PBP4, PBP7, (échelle : 0,5  $\mu$ m) (Heidrich *et al.*, 2002). D. Souche de *N. meningitidis* dont la transglycosylase lytique GNA33 a été inactivée ; les flèches blanches indiquent la membrane externe (échelle : 0,4  $\mu$ m) (Adu-Bobie *et al.*, 2004).



**Figure 13. Implication des hydrolases dans la formation du septum.** Observation de coupes en microscopie électronique à transmission. A. et B. Souche de *N. gonorrhoeae* mutée dans le gène codant pour la transglycosylase lytique LtgC, (échelle : 0,5  $\mu$ m) (Cloud and Dillard, 2004). C., D. et E. Souche de *S. aureus* dont l'amidase Sle1 a été inactivée, (échelle : 0,2  $\mu$ m) (Kajimura *et al.*, 2005).

En conclusion, si dans la majeure partie des cas étudiés, les hydrolases ne sont pas essentielles, un certain nombre d'entre elles présentant des spécificités enzymatiques variées interviennent pour séparer les cellules filles en fin de division. Elles deviennent, par leur fonction, essentielles à une morphologie normale. D'autre part, les deux derniers exemples sont intéressants car ils montrent que la transglycosylase lytique LtgC de *N. gonorrhoeae* et l'amidase Sle1 de *S. aureus* interviennent non seulement dans la séparation des cellules filles au cours de la division cellulaire mais également dans la synthèse du peptidoglycane au site de division.

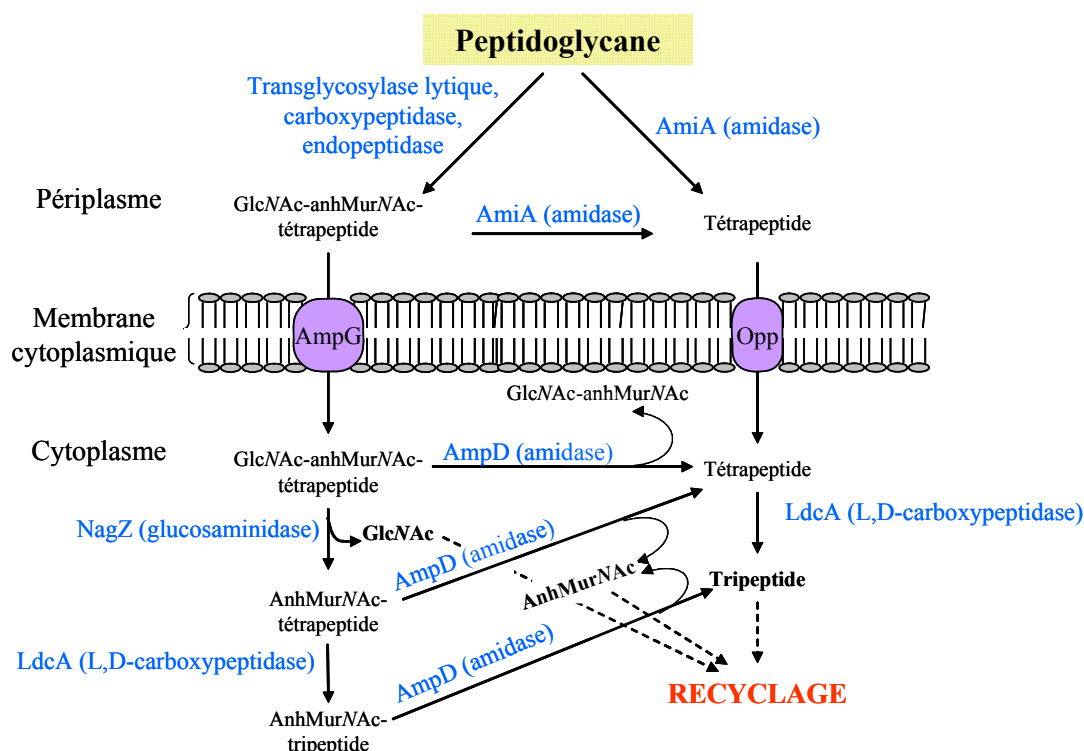
### III.3. Dégradation du peptidoglycane, recyclage et induction des $\beta$ -lactamases

A la différence des bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif peuvent recycler certains muropeptides issus de la dégradation de leur peptidoglycane. Ces produits peuvent ensuite être réutilisés dans la biosynthèse de peptidoglycane. Suite à l'addition d'antibiotiques, ces muropeptides présents en abondance peuvent servir de signal pour induire la production de  $\beta$ -lactamases. *E. coli* a développé deux moyens de recycler le peptidoglycane (Fig.14). La dégradation du peptidoglycane dans le périplasme par des transglycosylases lytiques, des endopeptidases et des carboxypeptidases conduit aux produits 1,6-anhydro-MurNAc-tétrapeptides. L'action de l'amidase périplasmique AmiA permet le clivage de la partie peptidique du peptidoglycane.

Le passage de ces produits de dégradation du périplasme au cytoplasme se fait par l'intermédiaire de deux perméases présentes dans la membrane cytoplasmique (Holtje, 1995) : la perméase Opp permet le transport de la partie peptidique du peptidoglycane tandis que la perméase AmpG permet le transfert des 1,6-anhydro-muropeptides dans le cytoplasme.

Les produits 1,6-anhydro-MurNAc-tétrapeptides se retrouvent dans le cytoplasme et sont la cible de l'amidase AmpD ainsi que de la glucosaminidase NagZ et de la L,D-carboxypeptidase LdcA conduisant à la production de tripeptide, de GlcNAc et de 1,6-anhydro-MurNAc (Jacobs *et al.*, 1994; Templin *et al.*, 1999; Votsch and Templin, 2000). Le tripeptide ainsi généré peut ensuite être recyclé pour la synthèse de nouveau peptidoglycane (Jacobs *et al.*, 1995). Il a été montré qu'un mutant délété du gène *ampD* présente une accumulation de produits 1,6-anhydro-MurNAc-tripeptide dans le cytoplasme (Jacobs *et al.*, 1994). AmpD clive spécifiquement la liaison amide entre un résidu 1,6-anhydro-MurNAc et l'acide aminé L-alanine (1) (Genereux *et*

*al.*, 2004). La partie saccharidique est aussi recyclée : les résidus GlcNAc et 1,6-anhydro-MurNAc sont convertis par étapes successives en UDP-GlcNAc réutilisé dans la synthèse du précurseur du peptidoglycane, le lipide II (Uehara *et al.*, 2005).



**Figure 14. Modèle du recyclage du peptidoglycane chez *E. coli*.** Les muropeptides, issus de la dégradation du peptidoglycane par des hydrolases (en bleu) dans le périplasme, sont transportés dans le cytoplasme par deux systèmes distincts de perméases. Les anhydro-muropeptides et la partie peptidique du peptidoglycane sont transportés respectivement via AmpG et Opp. Les muropeptides et le tétrapeptide se retrouvant dans le cytoplasme sont de nouveau la cible d'hydrolases (en bleu). Les produits tripeptide et saccharidiques (en gras) résultant peuvent alors être réutilisés dans la synthèse de précurseurs du peptidoglycane. (Adapté de Boneca, 2005 et de Templin *et al.*, 1999).

Les produits 1,6-anhydro-MurNAc-peptide sont également capables de déclencher l'induction spécifique de l'expression de la  $\beta$ -lactamase AmpC (Jacobs *et al.*, 1994). Ainsi donc, certaines bactéries répondent à l'action des  $\beta$ -lactamines en produisant une  $\beta$ -lactamase : la croissance inhibée par les  $\beta$ -lactamines s'accompagne d'une augmentation de la quantité de produits de dégradation du peptidoglycane et donc de 1,6-anhydro-MurNAc-peptide ce qui conduit à l'activation de AmpC. L'expression de AmpC est constitutive chez *E. coli*. A partir d'un plasmide transportant les gènes *ampC* et *ampR*, activateur transcriptionnel en présence de  $\beta$ -

lactamines d'*Enterobacter cloacae*, il a été montré que la suppression de l'activité des transglycosylases lytiques chez *E. coli* entraîne une diminution de la dégradation du peptidoglycane ainsi qu'une sensibilité plus aiguë aux  $\beta$ -lactamines résultant d'une activité  $\beta$ -lactamase fortement réduite voire absente (Korsak *et al.*, 2005; Kraft *et al.*, 1999).

Nous retrouvons dans le processus de recyclage et d'induction de l'activité  $\beta$ -lactamase, l'implication d'enzymes de clivage du peptidoglycane de spécificités variées.

### III.4. Virulence et pathogénèse

Plusieurs études ont montrées que les mucopeptides libérés par les bactéries interviennent dans des phénomènes de virulence et entraînent une réponse inflammatoire de l'hôte (Dokter *et al.*, 1994; Fleming *et al.*, 1986; Tuomanen *et al.*, 1986). Des fragments de peptidoglycane injectés à des rats seraient responsables d'arthrite, induiraient des méningites ou encore le sommeil (Fleming *et al.*, 1986; Krueger *et al.*, 1982; Tuomanen *et al.*, 1986).

Les principaux produits libérés par les bactéries à Gram négatif dont *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* et *Bordetella pertussis* sont des produits GlcNAc-1,6-anhydro-MurNAc-tétrapeptides ou cytotoxines (TCT). Ces produits sont cytotoxiques pour les cellules épithéliales ciliées et inhibent la fonction des neutrophiles (Boneca, 2005). La production de cette cytotoxine nécessiterait au moins l'action d'une transglycosylase lytique et d'une D,D-carboxypeptidase. Pour *N. meningitidis*, la D,D-carboxypeptidase PBP3 et la transglycosylase lytique MltB pourraient intervenir dans la production de cytotoxines de type mucopeptides puisque ces hydrolases participent au processus de virulence (Sun *et al.*, 2000). La transglycosylase lytique GN33 pourrait également jouer un rôle dans la virulence puisqu'une souche dont le gène correspondant a été inactivé est incapable de déclencher une septicémie chez le rat (Adu-Bobie *et al.*, 2004). Cependant, nous avons vu précédemment que cette même souche mutée formait des groupes de cellules. Aussi, il est tout à fait envisageable que cette anomalie morphologique soit directement responsable de l'atténuation de la virulence. Chez *N. gonorrhoeae*, deux transglycosylases lytiques AtlA et LtgA pourraient intervenir dans la libération de cytotoxines puisque les deux souches mutées pour les gènes correspondants montrent une diminution des fragments cytotoxiques libérés (Cloud and Dillard, 2002).

La virulence des bactéries à Gram positif ne devrait pas faire intervenir les produits 1,6-anhydro-muropeptides puisque l'activité transglycosylase lytique a été pour l'instant exclusivement identifiée chez les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif sporulant. Chez *L. monocytogenes*, l'endopeptidase P60 et le lysozyme NamA participeraient à la virulence. Des souches mutées dans ces deux gènes montrent une virulence réduite. Ces deux hydrolases du peptidoglycane seraient nécessaires à la production de GlcNAc-MurNAc-dipeptides, qui par interaction avec les protéines Nod2 du système immunitaire de l'hôte, pourraient activer une réponse inflammatoire (Boneca, 2005; Lenz *et al.*, 2003).

Il est dorénavant bien établi que les muropeptides et donc les hydrolases les générant sont impliqués dans le processus de pathogenèse. Cependant ce phénomène reste complexe, d'autant plus que beaucoup d'autres composantes de la paroi cellulaire entrent en jeu, comme les acides teichoïques et lipoteichoïques, la capsule polysaccharidique des bactéries à Gram positif ou les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif.

### III.5. Sporulation et germination

La sporulation est un phénomène survenant dans des conditions environnementales défavorables chez les espèces *Bacillus* et *Clostridium*. Les bactéries passent d'une croissance dite végétative à sporulante qui se traduit par la formation d'une spore dans le cytoplasme qui diffère de la cellule végétative par sa forme, sa structure, ses propriétés enzymatiques et sa capacité à résister à divers agents physiques et chimiques tels que chaleur, dessiccation, radiations. La membrane cytoplasmique est entourée de la paroi sporale et du cortex caractérisé par la présence de résidus  $\delta$ -lactam muramiques et de 25% de résidus MurNAc substitués par un seul acide aminé L-alanine (1) (Popham *et al.*, 1996). Cette simple substitution pourrait être due à LytH, une endopeptidase exprimée uniquement durant la sporulation (Horsburgh *et al.*, 2003). Un mutant délété du gène *lytH* présente une perte de cette simple substitution L-alanine (1) et une augmentation en substitution de térapeptide, ce qui indique que LytH cliverait la liaison peptidique entre les acides aminés L-alanine (1) et D-glutamate (2). Après formation, la cellule mère lyse et libère la spore. Chez *B. subtilis*, deux amidases de type autolysines interviennent durant ce processus, CwlB et CwlC. Les simples mutants *cwlB* ou *cwlC* lysent la cellule mère

tandis que le double mutant *cwlB/cwlC* ne la lyse plus (Kuroda and Sekiguchi, 1991; Lewis, 2000; Shida *et al.*, 2000). Une troisième amidase, CwlD, intervient dans la maturation du cortex afin de substituer à MurNAc un groupement  $\delta$ -lactam (Smith *et al.*, 2000). Un mutant *cwlD* ne présente plus de structure  $\delta$ -lactam qui est nécessaire à la germination des spores. L'inactivation de l'acide *N*-acétylmuramique désacétylase, PdaA, conduit au même phénotype (Fukushima *et al.*, 2005). Aussi, il a été proposé que la formation du cortex composé de résidus  $\delta$ -lactam muramiques résulterait de l'action de l'amidase CwlD puis de la désacétylation du résidu acide muramique par PdaA suivie d'une activité de transpeptidase.

Durant la germination des spores menant à une croissance végétative, des enzymes hydrolytiques de spécificité différente doivent dégrader le cortex. Le phénomène de germination nécessiterait au moins trois hydrolases différentes : une glucosaminidase, une transglycosylase lytique et probablement une amidase. Chez *B. subtilis*, un mutant délété du gène *sleB* codant pour une transglycosylase lytique présente une germination plus lente (Boland *et al.*, 2000). Le double mutant *sleB/cwlJ* ne peut plus quant à lui hydrolyser son cortex indiquant que CwlJ une glucosaminidase putative intervient aussi dans l'hydrolyse du cortex (Atrih and Foster, 2001; Chirakkal *et al.*, 2002). Les produits 1,6-anhydro-muropeptides formés, absents à la fin de la germination, seraient recyclés ou contribueraient à la régulation de gènes spécifiques de la germination (Atrih *et al.*, 1998; Boland *et al.*, 2000). De même, chez *Bacillus megaterium*, l'analyse par RP-HPLC, par détermination d'acides aminés et par spectrométrie de masse du peptidoglycane durant la germination a permis de mettre en évidence au moins deux hydrolases, une glucosaminidase et une transglycosylase lytique (Atrih *et al.*, 1999). Comme chez *B. subtilis*, l'activité transglycosylase lytique n'a pas été retrouvée après germination. Il a été suggéré que les hydrolases activées durant la germination pourraient reconnaître de façon spécifique les résidus  $\delta$ -lactam muramiques présents dans le peptidoglycane des spores. D'ailleurs, un mutant de *B. subtilis* de l'amidase *cwlD* ne présentant plus de groupement  $\delta$ -lactam ne peut plus hydrolyser son cortex (Smith *et al.*, 2000).

Des hydrolases sont nécessaires à la lyse de la cellule mère lors de la sporulation. D'autres sont impliquées dans la dégradation du cortex lors de la germination. Voici un nouvel exemple de différenciation cellulaire faisant intervenir des hydrolases du peptidoglycane spécifiques à un moment particulier du cycle de vie des bactéries.



### III.6. Système de sécrétion de type IV

Des transglycosylases lytiques sont souvent associées à l'assemblage de complexes membranaires dans les différents systèmes de sécrétion de type II (pilus type IV), III et IV des bactéries à Gram négatif. Une lyse locale du peptidoglycane permettrait de créer un passage assez large pour l'assemblage des transporteurs impliqués dans l'export de protéines et le transfert d'ADN permettant la recombinaison homologue et la conjugaison des bactéries (Dijkstra and Keck, 1996; Koraimann, 2003). Nous présentons ici comme exemple l'implication d'une transglycosylase lytique dans la formation du système de sécrétion de type IV chez *Agrobacterium tumefaciens*.

*A. tumefaciens* est une bactérie de la famille des rhizobiums qui se développe dans le sol. Elle est capable de se fixer sur les cellules de certaines plantes induisant une multiplication des cellules du végétal et donnant naissance à une formation tumorale appelée galle du collet. *A. tumefaciens* est capable de transférer un petit ADN plasmidique pTi (ADN-T) jusqu'aux cellules de la plante. Afin d'être transféré, cet ADN-T requiert un système de sécrétion de type IV avec formation de pilus. Le facteur de virulence VirB1, codant pour une transglycosylase lytique interviendrait dans la formation du pilus en assurant la translocation de macromolécules à travers l'enveloppe bactérienne (Hoppner *et al.*, 2004; Krall *et al.*, 2002). Lorsque cette protéine est mutée sur les résidus catalytiques acide glutamique et aspartate, une forte diminution de la virulence est observée associée à une réduction de cent à mille fois dans l'export de l'ADN-T (Llosa *et al.*, 2000; Mushegian *et al.*, 1996).

Les systèmes de sécrétion, très souvent associés à la pathogenèse des bactéries à Gram négatif envers les plantes et les animaux, nécessitent un réarrangement du peptidoglycane. Des transglycosylases lytiques interviendraient au cours de ce remodelage. Ce processus de transport sélectif de macromolécules nécessite une régulation adaptée.

### III.7. Formation des flagelles

Certaines bactéries possèdent des flagelles qui sont liés à la motilité cellulaire. Le flagelle est une structure flexible composée de trois parties, le filament, le crochet et le corpuscule basal.

Le filament est une hélice lévogyre constituée d'un polymère de flagelline. La formation de cette structure extracellulaire nécessiterait l'intervention d'hydrolases comme il a été montré chez *Salmonella typhimurium* (Dijkstra and Keck, 1996; Nambu *et al.*, 1999). Le domaine C-terminal de la protéine FlgJ de cette bactérie présente une activité d'hydrolyse du peptidoglycane. Une protéine FlgJ, mutée au niveau des acides aminés potentiellement catalytiques, présente une activité d'hydrolyse du peptidoglycane réduite. La souche mutée correspondante montre une très forte réduction de sa motilité pouvant indiquer un rôle de l'hydrolase FlgJ dans la formation des flagelles.

Ainsi, durant la formation des flagelles, des hydrolases interviendraient en réarrangeant localement l'hétéropolymère de peptidoglycane afin de générer une cavité nécessaire pour accueillir le corpuscule basal.

Tous les processus cellulaires présentés ici font intervenir des hydrolases qui participent soit à la lyse des bactéries, soit au remodelage local de peptidoglycane. Dans les deux cas, un fin contrôle temporel et spatial de l'activité des différentes hydrolases est crucial.

#### **IV. Régulation de l'activité des hydrolases**

Lewis émet l'hypothèse que l'autolyse chez les bactéries pourrait être associée à une mort cellulaire programmée (Lewis, 2000) dans les cas suivants : lyse de la cellule mère pour libérer la spore chez les espèces sporulant, autolyse spontanée, en phase stationnaire et en présence d'antibiotiques de certaines espèces. Peu de choses sont connues quant à la régulation de l'activité des hydrolases durant la croissance bactérienne. Un exemple de régulation chez *S. aureus* est cependant présenté ci-dessous.

Il a été mis en évidence l'existence de systèmes à deux composantes chez *S. aureus* qui pourraient contrôler l'activité des hydrolases. Un système *lrgAB* est supposé réguler négativement l'activité des hydrolases de *S. aureus* (Bayles, 2000; Groicher *et al.*, 2000; Rice and Bayles, 2003). En effet, un mutant *lrgAB* montre une activité plus importante des hydrolases et

une plus grande sensibilité à la pénicilline en phase stationnaire qui s'accompagne de la mort mais pas de la lyse des bactéries. Cette plus forte sensibilité à la pénicilline n'a pas été retrouvée en phase exponentielle. De plus, une surexpression de l'opéron *lrgAB* entraîne une diminution de l'activité des hydrolases et l'inhibition de la mort induite par la pénicilline. Ainsi, l'opéron *lrgAB* régulerait négativement l'activité des hydrolases extracellulaires et serait exprimé de façon maximale lorsque les cellules rentrent en phase stationnaire. D'autres régulateurs des gènes impliqués dans l'autolyse ont été identifiés chez *S. aureus*, comme le système *lytSR* dont l'activité influencerait *lrgAB* ; une souche délétée du gène *lytS* présenterait une lyse plus importante en présence de Triton-X100 (Groicher *et al.*, 2000). Un autre régulateur transcriptionnel *sarV* serait également impliqué dans le contrôle de l'autolyse puisqu'un mutant *sarV* serait plus résistant à la lyse induite par le Triton-X100 et la pénicilline G et montrerait une activité des hydrolases réduite (Manna *et al.*, 2004). *sarV* serait lui-même réprimé par deux autres protéines SarA et MgrA qui interagissent avec le promoteur de *sarV*. Ces exemples de régulation chez *S. aureus* montrent bien toute la complexité du contrôle de l'activité des hydrolases.

## V. Conclusion

Les hydrolases du peptidoglycane sont ubiquitaires dans le monde bactérien. En conditions de laboratoire, les hydrolases étudiées ne sont généralement pas essentielles à la survie de la bactérie. Cependant, elles sont essentielles dans des processus tels que l'autolyse, la croissance, la séparation des cellules filles en fin de division, la compétence, le recyclage du peptidoglycane, l'induction des  $\beta$ -lactamases, la virulence et la sécrétion des transporteurs macromoléculaires. De plus, ces fonctions cellulaires sont très souvent reliées entre elles ce qui augmente la difficulté à isoler et à définir la contribution des hydrolases dans ces processus. La présente introduction bibliographique ne tient pas compte de ces interconnexions. Le fait que plusieurs hydrolases interviennent souvent au sein de ces différents processus, une enzyme clivant la partie glycanique et une enzyme clivant la partie peptidique, complexifie encore plus l'analyse. Le tableau 2 reprend pour chaque espèce bactérienne, les différentes hydrolases citées dans cet exposé, leur activité enzymatique ainsi que leurs fonctions associées.

Espèces	Enzymes	Fonctions	Références
<i>E. coli</i>	<b>Amidases</b> AmiA, AmpD AmiA, AmiB, AmiC  <b>Transglycosylases lytiques</b> Slt70, MltA, MltB, MltC, MltD, EmtA  <b>Endopeptidases</b> MepA, PBP4 et PBP7  <b>Glucosaminidase</b> NagZ  <b>L,D-Carboxypeptidase</b> LdcA  <b>D,D-carboxypeptidase</b> PBP5, PBP6	Recyclage PG séparation cellules filles  Recyclage PG séparation cellules filles ? (rôle minoritaire)  séparation cellules filles (rôle minoritaire)  Recyclage PG  Recyclage PG  Croissance et division cellulaire	(Holtje, 1995; Jacobs <i>et al.</i> , 1994; Templin <i>et al.</i> , 1999) (Heidrich <i>et al.</i> , 2002)  (Holtje, 1995; Jacobs <i>et al.</i> , 1994; Templin <i>et al.</i> , 1999) (Heidrich <i>et al.</i> , 2002)  (Heidrich <i>et al.</i> , 2002)  (Votsch and Templin 2000)  (Templin <i>et al.</i> , 1999)  (Santos <i>et al.</i> , 2002; de Pedro <i>et al.</i> , 2003)
<i>B. subtilis</i>	<b>Amidases</b> CwlB, CwlC, CwlD  <b>Glucosaminidase</b> CwlJ  <b>Transglycosylase lytique</b> SleB  <b>Endopeptidases</b> LytH LytE, LytF, CwlF LytE	Sporulation  Germination  Germination  Sporulation Séparation cellules filles Autolyse	(Kuroda and Sekiguchi, 1991; Shida <i>et al.</i> , 2000; Smith <i>et al.</i> , 2000)  (Atrih and Foster, 2001; Chirakkal <i>et al.</i> , 2002)  (Boland <i>et al.</i> , 2000)  (Horsburgh <i>et al.</i> , 2003) (Ishikawa <i>et al.</i> , 1998; Yamamoto <i>et al.</i> , 2003) (Margot <i>et al.</i> , 1998)
<i>S. aureus</i>	<b>Amidase/glucosaminidase</b> Atl  <b>Amidase</b> SleI	Séparation cellules filles Autolyse  Division (septation ?)	(Takahashi <i>et al.</i> , 2002)  (Kajimura <i>et al.</i> , 2005)
<i>L. lactis</i>	<b>Glucosaminidase</b> AcmA	Séparation cellules filles Autolyse	(Buist <i>et al.</i> , 1995)
<i>N. gonorrhoeae</i>	<b>Transglycosylases lytiques</b> AtlA, LtgA LtgC	Pathogenèse et Autolyse Division (septation ?)	(Cloud and Dillard, 2002; Dillard and Seifert, 1997) (Cloud and Dillard, 2004)
<i>N. meningitidis</i>	<b>Transglycosylases lytiques</b> MltB, GNA33 GNA33  <b>D,D-Carboxypeptidase</b> PBP3	virulence séparation cellules filles  virulence	(Adu-Bobie <i>et al.</i> , 2004; Sun <i>et al.</i> , 2000) (Adu-Bobie <i>et al.</i> , 2004)  (Sun <i>et al.</i> , 2000)
<i>L. monocytogenes</i>	<b>Lysozyme</b> NamA  <b>Endopeptidase</b> P60	Pathogenèse  Pathogenèse Séparation cellules filles	(Boneca, 2005; Lenz <i>et al.</i> , 2003)  (Boneca, 2005; Kuhn and Goebel, 1989)
<i>A. tumefaciens</i>	<b>Transglycosylase lytique</b> VirB	Système sécrétion type IV	(Hoppner <i>et al.</i> , 2004; Krall <i>et al.</i> , 2002)
<i>S. typhimurium</i>	Hydrolase non caractérisée - FlgJ	Formation de flagelles	(Dijkstra and Keck, 1996; Nambu <i>et al.</i> , 1999)

Tableau 2. Hydrolases et fonctions associées.

Le laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules consacre l'essentiel de ses activités à l'étude de la résistance aux  $\beta$ -lactamines, à la division et à la virulence de *S. pneumoniae*, un pathogène majeur pour l'homme. Ces trois aspects de la biologie de la bactérie sont reliés au métabolisme du peptidoglycane. Dans ce travail bibliographique nous nous sommes donc intéressés aux enzymes de synthèse du peptidoglycane puis aux hydrolases du pneumocoque.

## **Le métabolisme du peptidoglycane chez *S. pneumoniae***

### **I. *S. pneumoniae*, un pathogène de l'homme devenu résistant aux antibiotiques**

*S. pneumoniae*, bactérie à Gram positif est un coque ovale. Ce pathogène de l'homme colonise les voies respiratoires supérieures de l'homme. Il est responsable de pharyngites, otites et sinusites. En envahissant les espaces alvéolaires des poumons, cette bactérie peut également déclencher des pneumonies. Des infections invasives comme les septicémies et les méningites sont possibles si la bactérie pénètre dans la circulation sanguine. Dans les pays développés, il affecte surtout les enfants en bas âge et les personnes âgées. A travers le monde, *S. pneumoniae* est la cause de 1,1 millions de décès par an.

Depuis 1940-1941, les infections dûes à *S. pneumoniae* sont traitées principalement par des  $\beta$ -lactamines. Dès 1967, la première souche résistante à la pénicilline G apparaît en Australie (Hansman *et al.*, 1974) et en 1978 en France (Hansman *et al.*, 1974; Peyrefitte *et al.*, 1979). Depuis les années 1970, la résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque n'a cessé d'augmenter. Actuellement en France, près de 50% des souches de *S. pneumoniae* isolées sont résistantes à la pénicilline G et certaines ont une sensibilité réduite à toutes les  $\beta$ -lactamines (Laurans *et al.*, 2001).

Chez *S. pneumoniae*, la résistance aux  $\beta$ -lactamines est corrélée à la diminution d'affinité de ces antibiotiques pour les PBPs (Dessen *et al.*, 2001). Les souches résistantes présentent des gènes mosaïques codant pour des PBPs modifiées, probablement issus de recombinaisons homologues avec des gènes provenant d'espèces streptococcales voisines *Streptococcus mitis* et *Streptococcus oralis* (Dowson *et al.*, 1989; Dowson *et al.*, 1990; Dowson *et al.*, 1993; Smith and Klugman, 1995). Durant mon DEA, j'ai contribué à l'étude des mécanismes de résistance chez *S. pneumoniae* liés à la PBP monofonctionnelle PBP2b à partir de huit souches de résistants cliniques (Pagliero *et al.*, 2004). Ce travail est présenté en annexe.

Une stratégie pour faire face à l'accroissement de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *S. pneumoniae* consiste à étudier les fonctions vitales de la bactérie afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce but, nous nous intéressons à la division cellulaire au cours de laquelle le peptidoglycane est remodelé.

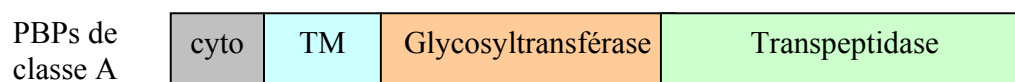
## II. La synthèse du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*

### II.1. Les PBPs de haut poids moléculaire de *S. pneumoniae*

Les étapes finales de synthèse de peptidoglycane font intervenir les PBPs de haut poids moléculaire dans la polymérisation des sucres par une activité de glycosyltransférase et dans la réticulation des chaînes glycanes par transpeptidation.

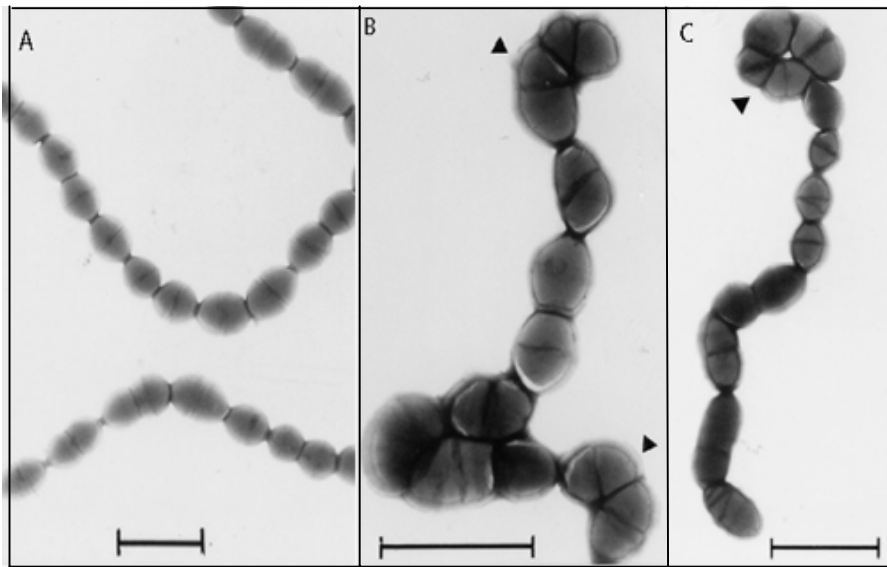
Chez *S. pneumoniae*, il existe cinq PBPs de haut poids moléculaires, de localisation extracellulaire, et ancrées à la membrane cytoplasmique. Les PBPs peuvent être classés en deux groupe : les PBPs de classe A et les PBPs de classe B.

Les PBPs de classe A sont des enzymes bifonctionnelles qui possèdent les activités glycosyltransférase et transpeptidase. PBP1a, PBP1b et PBP2a de *S. pneumoniae* appartenant à cette classe s'organisent de façon similaire. La topologie de ces enzymes comprend une courte région cytoplasmique suivie du domaine d'ancrage à la membrane cytoplasmique et des domaines catalytiques portant l'activité glycosyltransférase puis transpeptidase (Fig.15).



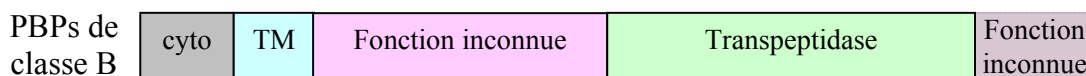
**Figure 15. Représentation schématique de la topologie des PBPs classe A.** cyto : région cytoplasmique ; TM : ancrage transmembranaire.

L'activité glycosyltransférase a été mise en évidence pour PBP2a (Di Guilmi *et al.*, 2003). Il a par ailleurs été montré que PBP1b lie le lipide II, substrat de la réaction de glycosyltransfert (Di Guilmi *et al.*, 2003). La croissance de *S. pneumoniae* ne semble pas être perturbée par les délétions individuelles des PBPs de classe A (Paik *et al.*, 1999). La présence d'au moins PBP1a ou PBP2a est cependant essentielle à la viabilité de la bactérie. Les souches issues des doubles inactivations de PBP1a et PBP1b ou PBP2a et PBP1b présentent des anomalies au niveau de la localisation du septum (Fig.16) (Paik *et al.*, 1999).



**Figure 16. Effet de l'inactivation des PBPs de classe A de *S. pneumoniae*.** (D'après Paik *et al.*, 1999). Observation par microscopie électronique après coloration négative des cellules cultivées en présence de 2% choline. A. Souche sauvage. B. Souche délétée de *pbp1a* et *pbp1b*. C. Souche délétée de *pbp2a* et *pbp1b*. Les flèches noires indiquent les angles de septation aberrants (échelle : 2  $\mu$ m).

Les deux PBPs monofonctionnelles de classe B de *S. pneumoniae*, PBP2x et PBP2b, sont essentielles. Ces deux protéines présentent une courte région cytoplasmique, un ancrage membranaire, un domaine extracellulaire N-terminal de fonction inconnue suivi du domaine catalytique transpeptidase (Fig.17). Leur topologie diverge légèrement par la présence d'un domaine C-terminal de fonction inconnue pour PBP2x, absent pour PBP2b.



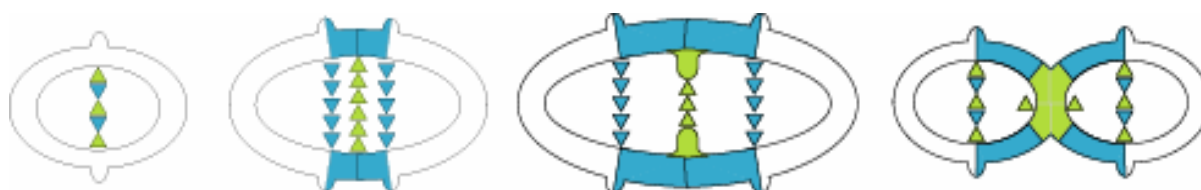
**Figure 17. Représentation schématique de la topologie des PBPs classe B.** cyto : région cytoplasmique ; TM : ancrage transmembranaire. PBP2x possède un domaine C-terminal de fonction inconnue.

Le gène de PBP2x se localise dans le groupe de gènes *dcw* (division and cell wall) codant pour des protéines impliquées dans la division cellulaire (Massidda *et al.*, 1998). PBP2x participe effectivement à la synthèse de peptidoglycane septal (Morlot *et al.*, 2003).



## II.2. Croissance et division cellulaire chez *S. pneumoniae*

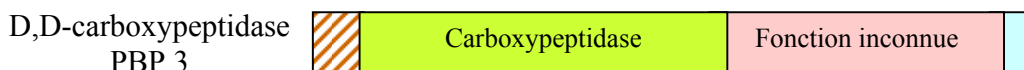
La synthèse de peptidoglycane au cours de la croissance et de la division cellulaire fait intervenir les PBPs de haut poids moléculaire. A partir de la localisation de ces protéines chez *S. pneumoniae* au cours du cycle cellulaire, un modèle de synthèse du peptidoglycane a été proposé (Morlot *et al.*, 2003). Ainsi, trois sites de synthèse ont été mis en évidence (Fig.18) : un premier au site de division où le septum est formé et deux autres aux sites équatoriaux où a lieu la synthèse de peptidoglycane impliquée dans l'élongation. Il a été montré qu'une PBP bifonctionnelle et une PBP monofonctionnelle se localisent à chacun des sites. Ainsi, PBP2b et PBP2a sont spécifiquement impliquées dans la synthèse de peptidoglycane périphérique. Cette dernière débute avant celle du septum qui nécessite PBP2x et PBP1a.



**Figure 18. Modèle de synthèse du peptidoglycane septal et périphérique.** (D'après Morlot *et al.*, 2003). La synthèse de peptidoglycane périphérique (en bleu) implique PBP2b et PBP2a représentées par les triangles bleus. Les triangles verts représentent PBP2x et PBP1a impliquées dans la synthèse de peptidoglycane septal (en vert).

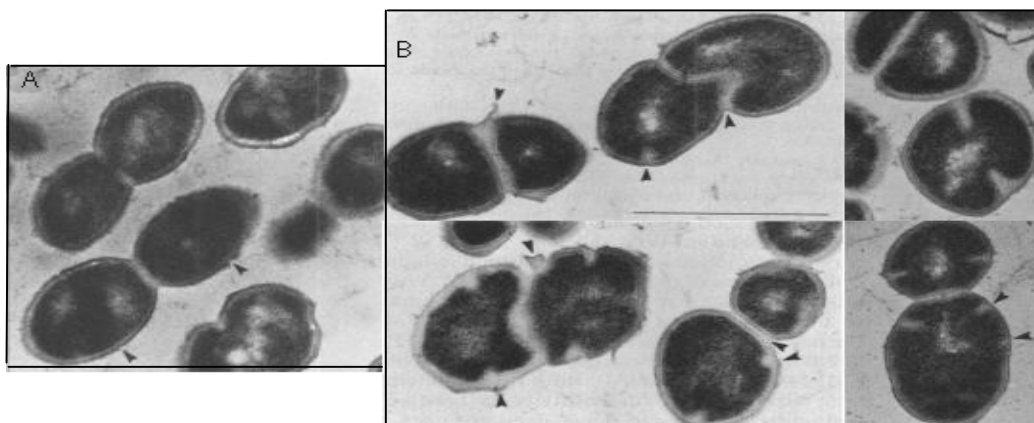
## II.3. PBP3, une D,D-carboxypeptidase impliquée dans la régulation de la division cellulaire chez *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* ne possède qu'une seule PBP non essentielle de faible poids moléculaire, PBP3. Le gène *dacA* code pour le précurseur de PBP3 qui possède un signal peptide d'export, suivi du domaine carboxypeptidase et d'un domaine de fonction inconnue. La protéine mature s'associe à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire d'une hélice C-terminale amphiphile (Fig.19).



**Figure 19. Représentation schématique de la topologie de PBP3.** Le rectangle hachuré en marron et le rectangle bleu correspondent respectivement au peptide signal et à l'hélice C-terminale amphiphile.

L'activité D,D-carboxypeptidase caractérisée par le clivage du dernier acide aminé D-alanine (5) du pentapeptide du peptidoglycane a été mise en évidence *in vitro* à partir d'UDP-muramyl-pentapeptide (Hakenbeck and Kohiyama, 1982). Afin de mieux caractériser le rôle de PBP3, la souche mutée pour le gène *dacA* a été réalisée. Cette souche présente de sévères aberrations morphologiques (Schuster *et al.*, 1990) : plusieurs ébauches de septum par cellule apparaissent et certaines cellules adoptent une morphologie plus sphérique (Fig.20). Ces aberrations de formes s'accompagnent, chez la souche mutée, d'une augmentation en pentapeptides dans le peptidoglycane mature par rapport aux cellules de type sauvage (Severin *et al.*, 1992). Aussi, PBP3 aurait un rôle dans les processus de croissance et de division cellulaire. Cette D,D-carboxypeptidase régulerait le degré de réticulation du peptidoglycane puisqu'un résidu muro-tétrapeptide ne peut plus être donneur lors de la réaction de transpeptidation.



**Figure 20. Effet de l'inactivation de PBP3 de *S. pneumoniae*.** Observation par microscopie électronique à transmission de coupes de cellules. A Souche sauvage. Les flèches indiquent les septa en croissance B. Souche dont la D,D-carboxypeptidase PBP3 a été inactivée présentant plusieurs septa indiqués par les flèches et une épaisseur inégale de peptidoglycane. (échelle : 1µm) (Schuster *et al.*, 1990).

Un rôle plus approfondi de PBP3 dans la division cellulaire a été recherché par immunolocalisation. La localisation cellulaire de PBP3 a montré que lorsque les cellules ne se divisent pas, la protéine se trouve sur toute la surface de la cellule sauf au niveau du futur site de division : ceci permet d'enrichir cette zone en pentapeptides, substrat des PBPs. Puis la protéine se concentre sur les zones de peptidoglycane nouvellement synthétisé clivant probablement le D-alanine terminal (5). Cette hydrolyse préviendrait toute future réaction de transpeptidation, régulant de la sorte le degré de réticulation du peptidoglycane mature (Morlot *et al.*, 2004). La localisation des cinq PBPs de haut poids moléculaire au futur site de division semble dépendre de PBP3 et donc de la présence de pentapeptides susceptibles de participer à la réaction de transpeptidation.

Ainsi, PBP3 est une D,D-carboxypeptidase intervenant indirectement dans la localisation des PBPs au cours de la division cellulaire. La fonction cellulaire de cette hydrolase membranaire intervenant dans la synthèse du peptidoglycane a été bien caractérisée. *S. pneumoniae* possède cinq autres hydrolases. Quel(s) rôle(s) jouent-elles dans le remodelage du peptidoglycane et la division cellulaire ?

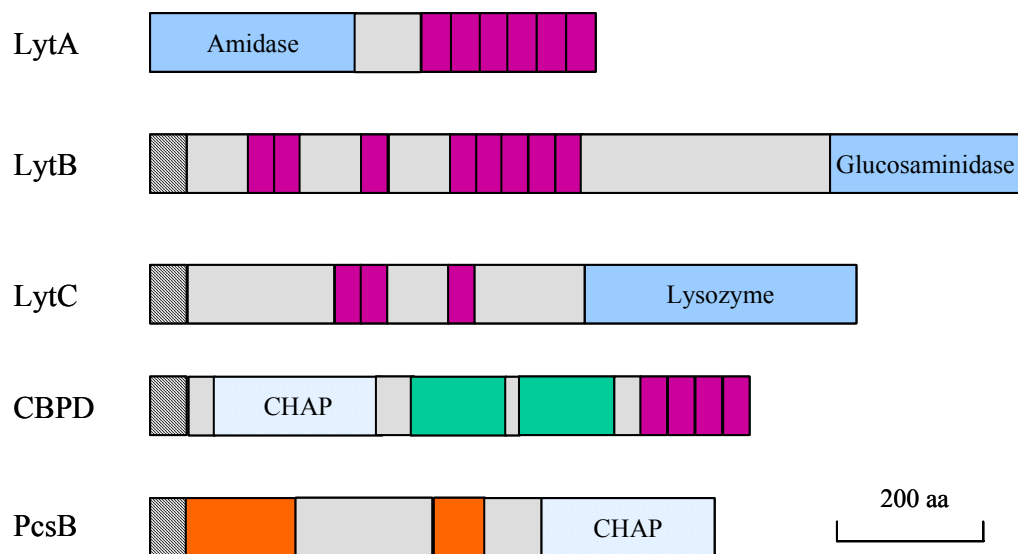
### **III. Les enzymes de clivage du peptidoglycane de *S. pneumoniae***

Chez *S. pneumoniae*, l'activité d'hydrolyse du peptidoglycane amidase a été mise en évidence pour LytA. LytB et LytC porteraient respectivement les activités glucosaminidase et lysozyme. Il existe deux endopeptidases potentielles supplémentaires possédant un domaine CHAP : CbpD (Choline-binding Protein D) et PcsB. Cette dernière est la seule hydrolase essentielle de *S. pneumoniae* (Ng *et al.*, 2004).

Avant d'aborder les différentes fonctions des enzymes de clivage du peptidoglycane identifiées chez *S. pneumoniae*, nous présentons leur topologie.

### III.1. Topologie des hydrolases du peptidoglycane de *S. pneumoniae*

Les différentes enzymes de clivage du peptidoglycane de *S. pneumoniae* présentent une structure modulaire (Fig.21). Cette bactérie possède quatre hydrolases capables de se lier aux résidus choline des acides teichoïques : l'amidase LytA et l'endopeptidase CbpD possèdent un domaine C-terminal « Choline-Binding » et un domaine N-terminal renfermant l'activité enzymatique (Fernandez-Tornero *et al.*, 2001; Holtje and Tomasz, 1975). La glucosaminidase LytB présente tout comme le lysozyme LytC un domaine « Choline-Binding » en position N-terminale et un domaine C-terminal portant l'activité catalytique (Garcia *et al.*, 1989; Lopez *et al.*, 2000). CbpD possède, en plus d'un domaine CHAP, deux domaines SH3 d'interaction protéique souvent associés aux hydrolases. PcsB renferme également un domaine CHAP associé à un motif « leucine zipper » (Ng *et al.*, 2004). Ce motif « coiled-coil » composé de deux ou plusieurs hélices alpha pourrait intervenir dans la dimérisation de PcsB ou l'interaction avec d'autres protéines. Toutes ces hydrolases, à l'exception de LytA, possèdent un peptide signal d'export à travers la membrane plasmique.



**Figure 21. Représentation schématique de la topologie des enzymes de clivage du peptidoglycane de *S. pneumoniae*.** Les rectangles hachurés en noirs représentent les peptides signaux. Les domaines catalytiques d'hydrolyse du peptidoglycane sont en bleus. Les rectangles violets correspondent aux motifs Choline-Binding, les verts aux motifs SH3 et les oranges aux régions « coiled-coil ».

## III.2. Fonctions des hydrolases du peptidoglycane de *S. pneumoniae*

### III.2.1. Autolyse

L'autolyse spontanée est observée lorsqu'une culture de *S. pneumoniae* de type sauvage atteint la phase stationnaire. Une sous-population bactérienne survit cependant jusqu'à vingt jours après autolyse (Henriques Normark and Normark, 2002). Il semblerait qu'en réponse à un stress, l'élimination de la plupart des cellules puisse être nécessaire pour fournir un apport suffisant en nutriments aux bactéries non lysées et ainsi assurer la survie de l'espèce dans des conditions peu favorables (Rice and Bayles, 2003). D'autre part, l'autolyse d'une sous-population permettrait de libérer de l'ADN donneur durant la compétence naturelle, ou encore de libérer des mucopeptides lors de l'infection d'un hôte (Kausmally *et al.*, 2005).

L'amidase LytA a été la première autolysine identifiée (Mosser and Tomasz, 1970). *S. pneumoniae* est une bactérie qui lyse spontanément en phase stationnaire. L'inactivation non létale du gène *lytA* entraîne l'absence de lyse en phase stationnaire, en présence de détergents et en présence de  $\beta$ -lactamines (Ronda *et al.*, 1987; Sanchez-Puelles *et al.*, 1986; Tomasz *et al.*, 1988). Cette hydrolase intervient donc dans la bactériolyse. Cette dernière résulterait d'un déséquilibre entre l'action des synthétases et des hydrolases du peptidoglycane ou d'une dérégulation de l'activité autolytique (Kitano and Tomasz, 1979; Tomasz *et al.*, 1988).

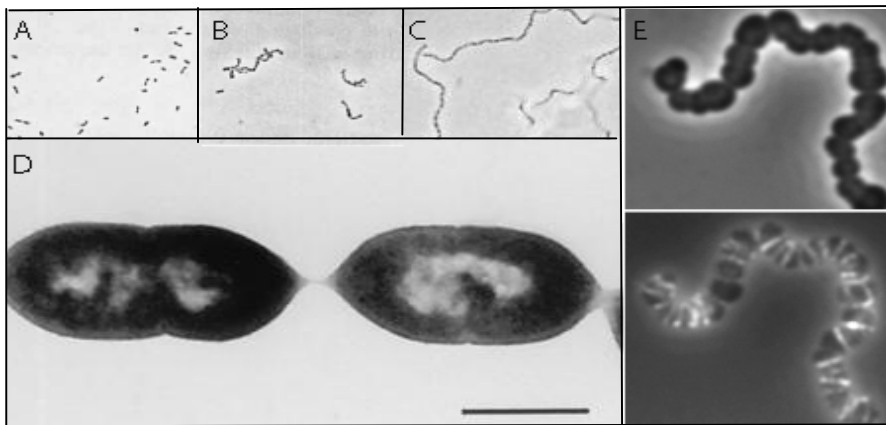
De même une souche dont le gène *lytC* a été inactivé s'avère être résistante à la lyse à 30°C. Lorsque l'enzyme LytC purifiée est ajoutée de façon exogène, un retour à la lyse est observé indiquant que LytC est une autolysine agissant à 30°C, contrairement à LytA qui est active à 37°C (Garcia *et al.*, 1999).

Ainsi, LytA est l'autolysine majeure de *S. pneumoniae* qui intervient en phase stationnaire mais aussi, pour une partie, dans la bactériolyse résultant de la présence de  $\beta$ -lactamines.

### III.2.2. Séparation des cellules filles

L'analyse morphologique de souches mutées au niveau des hydrolases pneumococcales ainsi que l'observation de leur localisation au cours du cycle cellulaire a permis d'étudier le rôle

des enzymes de clivage du peptidoglycane dans la division. Il a été montré que LytA a une localisation principalement septale et qu'une souche, dont le gène *lytA* a été inactivé, présente la formation de courtes chaînes de six à huit cellules indiquant un rôle mineur de cette enzyme dans la division (Fig.22.B.) (De Las Rivas *et al.*, 2002). L'inactivation du gène *lytB* conduit à la formation de très longues chaînes pouvant atteindre une centaine de cellules (Fig.22.C. et D.) (Garcia *et al.*, 1999). Lorsque l'enzyme purifiée LytB est ajoutée de façon exogène à une culture du mutant *lytB*, de courtes chaînes ou des dicoques semblables à une culture de souche de type sauvage apparaissent (De Las Rivas *et al.*, 2002). Ces éléments ainsi que la mise en évidence d'une localisation polaire de LytB indiquent que cette glucosaminidase intervient dans les étapes terminales de la division cellulaire pour séparer les cellules filles. Une troisième enzyme joue un rôle dans la séparation des cellules filles chez *S. pneumoniae*. Il s'agit de l'endopeptidase essentielle PcsB (Ng *et al.*, 2004). Une souche dans laquelle son expression a été réduite forme de longues chaînes où le septum apparaît bien formé. L'expression minimale de cette protéine, nécessaire à la viabilité de la souche, entraîne l'apparition de cellules plus volumineuses et circulaires dans lesquelles les régions de synthèse du peptidoglycane septal se localisent de manière irrégulière. Ces cellules, résultant d'une synthèse anormale, indiqueraient un rôle de PcsB dans la synthèse du peptidoglycane septal (Fig.22.E.).



**Figure 22. Effet de l'inactivation des hydrolases du peptidoglycane LytA, LytB et PcsB de *S. pneumoniae*.** (D'après De Las Rivas *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2004; Ronda *et al.*, 1987). A., B., C. Observations en microscopie de contraste de phase des cellules de *S. pneumoniae*. A Souche sauvage. B. Souche dont l'amidase LytA a été inactivée. C. Souche dont le gène *lytB* a été muté. D. Coupe en microscopie électronique d'une souche délétée de *lytB* (échelle : 1μm). E. Observation en microscopie de contraste de phase et en fluorescence de cellules sous-exprimant PcsB, marquées avec de la vancomycine fluorescente de manière à détecter les régions où se trouvent le peptidoglycane néo-synthétisé.

Ainsi, LytB et PcsB jouent un rôle majeur dans la séparation des cellules filles alors que LytA n'interviendrait que de façon minoritaire. De plus, PcsB pourrait avoir une fonction dans la synthèse du peptidoglycane.

### III.2.3. Transformation génétique et compétence

Chez *S. pneumoniae*, la compétence est induite par un peptide phéromone, le CSP (Competence Stimulating Peptide), exprimé à partir du gène *comC* en réponse à une certaine densité cellulaire appelée « quorum-sensing ». Le CSP est directement relié au système de régulation à deux composantes *comDE*. A partir de puces à ADN, il a été montré que l'opéron *comCDE* interviendrait dans la régulation de plus de cent gènes dont les gènes codant pour les hydrolases LytA, LytC et CbpD de façon directe ou indirecte. Le gène *lytA* est d'ailleurs localisé dans le même opéron que *recA*, responsable de la recombinaison homologue (Peterson *et al.*, 2000). L'amidase LytA ainsi que le lysozyme LytC auraient un rôle dans la libération d'ADN dans le milieu durant la compétence (Kuroda and Sekiguchi, 1991; Moscoso and Claverys, 2004). Récemment, il a été démontré que chez *S. pneumoniae*, seule une sous-population bactérienne est lysée, les cellules compétentes étant capables de déclencher la lyse des cellules non compétentes. Ce phénomène, appelé allolyse, implique en plus d'un système bactériocine (*cibABC*), trois hydrolases du peptidoglycane : LytA, LytC et CbpD (Guiral *et al.*, 2005). Une autre équipe travaillant sur la compétence a aussi montré que l'inactivation de l'endopeptidase CbpD conduit à l'atténuation de la lyse d'une sous-population bactérienne ainsi qu'à une diminution de la quantité d'ADN libéré dans le milieu (Kausmally *et al.*, 2005). Dans leurs conditions expérimentales, LytC n'interviendrait pas et CbpD coopérerait avec LytA qui aurait le rôle majoritaire dans la lyse et la libération d'ADN.

Il a donc été proposé l'existence de différents mécanismes permettant de libérer l'ADN durant la compétence qui dépendraient de l'expression tardive ou précoce des hydrolases impliquées dans la compétence (Kausmally *et al.*, 2005) : LytA et CbpD joueraient un rôle dans les étapes précoces de la compétence puis LytC interviendrait conjointement à LytA dans les étapes plus tardives.

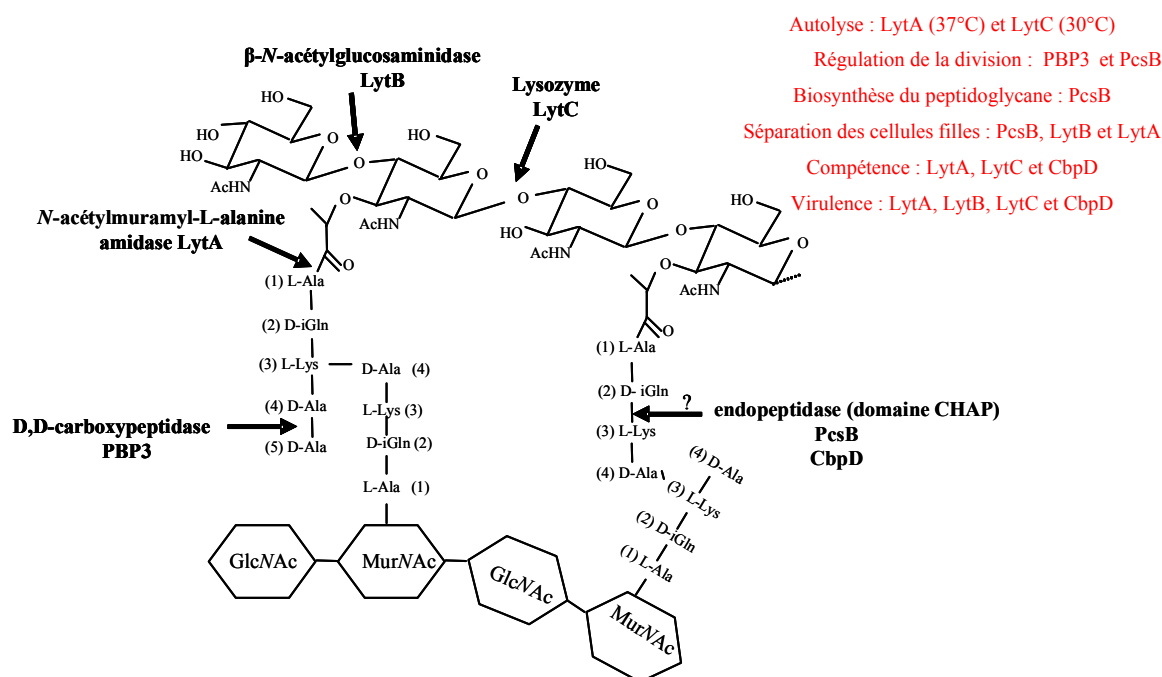
### III.2.4. Virulence et pathogénèse

LytA, LytB, LytC et CbpD pourraient également jouer un rôle dans la virulence. Les souches virulentes D39 et G54 de type sauvage dont le gène *lytA* a été inactivé montrent une atténuation de la virulence dans le modèle de pneumonie et de septicémie chez la souris (Berry *et al.*, 1989; Polissi *et al.*, 1998). Le rôle précis de LytA dans la pathogénèse n'a pas été identifié. LytA pourrait intervenir dans la libération de molécules toxiques comme la pneumolysine ou de mucopeptides à moins que l'atténuation de la virulence de la souche mutante ne soit liée à de forts changements de surface, ou à la formation de courtes chaînes (Balachandran *et al.*, 2001). LytB, LytC et CbpD auraient aussi une fonction dans la virulence qui se traduit par la colonisation du nasopharynx réduite d'un facteur cinq, quinze et deux pour les mutants *lytB*, *lytC*, et *cbpD* respectivement (Gosink *et al.*, 2000). Une diminution de l'adhérence cellulaire est également observée lorsque le lysozyme LytC est inactivé à 30 °C, température probable du nasopharynx (Gosink *et al.*, 2000).

Les phénotypes de virulence atténuée observés par les mutants d'hydrolases pourraient être directement liés à l'absence de LytA, LytB, LytC et CbpD ou bien résulter d'une conséquence indirecte telle que par exemple, les modifications morphologiques du mutant *lytB* formant des chaînes composées de plus cent cellules.

La figure 23 récapitule les différentes enzymes de clivage du peptidoglycane de *S. pneumoniae* et leurs fonctions cellulaires.





**Figure 23. Les enzymes de clivage du peptidoglycane de *S. pneumoniae* et leurs fonctions associées.**

### III.3. La désacylation du peptidoglycane pourrait-elle réguler l'activité des hydrolases chez *S. pneumoniae* ?

Tous les sucres du peptidoglycane de *S. pneumoniae* ne sont pas entièrement *N*-acétylés sur le carbone C2. Seuls 16% des résidus GlcNAc et 90% des résidus MurNAc le sont. PgdA est une *N*-acetylglucosamine désacétylase qui intervient dans la modification du peptidoglycane. L'hypothèse d'une régulation spatiale et temporelle de l'activité des hydrolases par le degré d'acétylation du peptidoglycane a été proposée : l'inactivation du gène *pgdA* entraîne la production de chaînes glycanes entièrement *N*-acétylées. Contrairement à une souche de type sauvage qui n'est pas sensible au lysozyme exogène, une souche mutée présente une hypersensibilité au lysozyme en phase stationnaire de croissance (Vollmer and Tomasz, 2000). Cette hypersensibilité au lysozyme s'accompagne d'une réduction de la virulence pour une souche encapsulée *pgdA* mutée (Vollmer and Tomasz, 2002). De plus, l'amidase LytA montre une activité fortement réduite sur le peptidoglycane acétylé (Vollmer and Tomasz, 2000).

Ainsi, la localisation spatiale des hydrolases pneumococcales pourrait être régulée par PgdA. Si cette *N*-acétylglucosamine désacétylase est exprimée uniquement à certains moments de la croissance bactérienne, un contrôle temporel de l'activité des hydrolases est également envisageable.

#### IV. Conclusion

Chez *S. pneumoniae*, les étapes de synthèse de peptidoglycane faisant intervenir les PBPs de haut poids moléculaire sont désormais bien connues. Le rôle de la D,D-carboxypeptidase PBP3 dans la régulation de la division cellulaire a également été caractérisé. PBP3 dirigerait la localisation adéquate des PBPs au cours de la synthèse du peptidoglycane périphérique et septale. Le processus d'incorporation du peptidoglycane nouvellement formé à l'hétéropolymère déjà existant n'est pas connu. Or cette étape dans la biosynthèse de peptidoglycane doit nécessiter l'intervention d'hydrolases clivant les chaînes glycanes existantes. Les hydrolases LytA, LytC et CbpD de *S. pneumoniae* sont connues pour leur rôle dans la lyse des cellules nécessaire à la libération d'ADN, de protéines ou encore de mucopeptides durant la compétence et la pathogenèse de la bactérie. Deux autres hydrolases, LytB et PcsB, sont quant à elles, impliquées dans la séparation des cellules filles, étape finale de la division cellulaire. PcsB, enzyme essentielle portant une activité endopeptidase modulerait également la synthèse de peptidoglycane. Or, dans les différents processus cellulaires, le plus souvent, une enzyme clivant la partie peptidique intervient de façon coordonnée avec une enzyme qui clive la partie glycane. En conclusion, dans le jeu d'enzymes connues pour cliver le peptidoglycane de *S. pneumoniae*, aucune hydrolase des chaînes glycanes participant à la biosynthèse du peptidoglycane n'a encore été décrite.

## Présentation des travaux

Le peptidoglycane est un composant majeur de la paroi cellulaire bactérienne. Durant les processus de croissance et de division cellulaire, il doit être remodelé tout en restant intègre afin d'éviter la lyse cellulaire. Au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules de l'Institut de Biologie Structurale (LIM-IBS), les étapes extracellulaires de la division de *S. pneumoniae* mettant en jeu les PBPs dans la croissance équatoriale et la septation du peptidoglycane ont été particulièrement étudiées. Il a notamment été montré que PBP2x possédant un domaine transpeptidase et PBP1a portant les domaines transpeptidase et glycosyltransférase se localisent spécifiquement au site de division et exercent donc probablement leur activité de synthèse du peptidoglycane à ce site : le septum (Morlot *et al.*, 2003). Les PBPs de haut poids moléculaires de classe A PBP2a et de classe B PBP2b se localisent quant à elles aux sites équatoriaux où a lieu la synthèse de peptidoglycane conduisant à la croissance équatoriale. PBP2x et PBP2b sont essentielles tandis que l'inactivation individuelle des PBPs de classe A est tolérée. D'autre part, des clichés en microscopie électronique de doubles mutants PBP1a/PBP1b et PBP2a/PBP1b montrent des irrégularités de taille des cellules et des aberrations de positions du septum (Paik *et al.*, 1999). PBP3, une D,D-carboxypeptidase membranaire est également impliquée dans les étapes précoces de la division cellulaire : une souche mutée au niveau du gène *dacA* codant pour PBP3 présente de sévères aberrations morphologiques avec plusieurs ébauches de septa (Schuster *et al.*, 1990). PBP3 clive le résidu D-alanine à l'extrémité du pentapeptide, prévenant ainsi le pontage entre les chaînes glycosidiques par l'activité transpeptidase des PBPs. Il a été proposé que PBP3 régulerait spatialement et temporellement le taux de pentapeptides disponibles sur le pourtour cellulaire en favorisant la présence de pentapeptides au futur site de division. PBP3 permettrait ainsi la localisation des PBPs (Morlot *et al.*, 2004).

Ainsi, chez *S. pneumoniae* les PBPs exercent leur activité de synthèse du peptidoglycane de manière contrôlée dans le temps et dans l'espace. La régulation de leur localisation, dépendant probablement de l'hydrolase du peptidoglycane PBP3, conduit à la formation du septum bien localisé durant la division cellulaire.

Le métabolisme du peptidoglycane fait intervenir d'autres hydrolases qui selon toute vraisemblance doivent agir de manière concertée avec les enzymes PBPs de synthèse durant la

croissance et la division cellulaire. En effet, deux espèces formant des coques, *N. gonorrhoeae* et *S. aureus* délétées respectivement de la transglycosylase lytique LtgC et de l'amidase SleI présentent la formation de plusieurs septa anormaux dans différents plans ce qui occasionne l'élargissement des cellules (Cloud and Dillard, 2004, 255). Ces deux hydrolases interviennent ainsi dans la formation du septum. Dans la présentation bibliographique qui précède, nous avons détaillé les fonctions jouées par des amidases, des glucosaminidases, des transglycosylases lytiques, des endopeptidases et des carboxypeptidases au cours de la séparation des cellules filles, étape ultime de la division bactérienne. Chez *S. pneumoniae*, par exemple, les hydrolases LytA, LytB et PcsB sont impliquées dans la séparation des cellules filles. Les enzymes LytA et LytB se lient aux résidus choline des acides teichoïques et PcsB possède un peptide signal d'export. Ces protéines devraient donc se localiser sur les couches externes du peptidoglycane, jouant plus facilement leur rôle dans la séparation des cellules filles. Lorsque l'expression de l'endopeptidase essentielle PcsB est fortement réduite, des cellules plus volumineuses présentant un positionnement irrégulier du septum apparaissent soulignant un rôle important dans la régulation de la synthèse de peptidoglycane. Chez *S. pneumoniae*, une enzyme clivant les chaînes glycanes du peptidoglycane et agissant dans la régulation de la synthèse de peptidoglycane septal n'a pas encore été identifiée. Cette enzyme pourrait intervenir dans le positionnement du septum en dégradant par exemple le peptidoglycane septal formé à des positions anormales dans la cellule. Ceci impliquerait que cette enzyme soit localisée à proximité du peptidoglycane néo-synthétisé. Elle pourrait aussi interagir avec les enzymes de synthèse : les PBPs. D'ailleurs, de telles interactions ont déjà été identifiées chez *E. coli* (Romeis and Holtje, 1994). En effet, la transglycosylase lytique Slt70 interagit notamment *in vitro* avec PBP3 d'*E. coli*, l'homologue de PBP2x, synthétase septale de *S. pneumoniae*. Cette observation a stimulé notre intérêt pour rechercher un homologue de Slt70 chez *S. pneumoniae*.

Ainsi, Otto Dideberg du Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire de l'Institut de Biologie Structurale (LCM-IBS) a identifié par recherche bio-informatique une séquence qui pourrait coder pour une nouvelle hydrolase du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*. Cette enzyme, Pmp23, de 204 acides aminés possède un ancrage membranaire du côté N-terminal. Il était donc intéressant d'étudier le rôle de cette nouvelle hydrolase : quelle est son activité enzymatique ? Dans quel(s) processus cellulaire(s) intervient-elle ? Joue-t-elle un rôle dans la

synthèse du peptidoglycane septal ? Est-elle impliquée dans les étapes de régulation de la division cellulaire ? Quel est son rôle par rapport aux autres hydrolases de *S. pneumoniae* ?

La première partie de ce travail repose sur l'analyse bio-informatique qui a permis de mettre en évidence, chez *S. pneumoniae*, un domaine que nous avons appelé PECACE, pour PEptidoglycan CARbohydrate Cleavage Enzyme (Publication n°I). Ce domaine identifié exclusivement chez les bactéries à Gram positif se trouve souvent associé à d'autres domaines connus pour lier ou hydrolyser le peptidoglycane.

Par la suite, les travaux effectués ont eu pour but de caractériser le rôle physiologique de la nouvelle hydrolase du peptidoglycane de *S. pneumoniae*, Pmp23 portant le domaine PECACE. L'analyse phénotypique d'une souche de *S. pneumoniae* délétée du gène *pmp23* d'une part, et la mise en évidence d'une activité d'hydrolyse de la paroi bactérienne contenant du peptidoglycane par la protéine recombinante d'autre part, ont permis de proposer un rôle pour Pmp23 dans le métabolisme du peptidoglycane au moment de la formation du septum au cours de la division cellulaire (Publication n°II).

## Contributions aux travaux

T. Vernet et A.M. Di Guilmi du Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules de l'Institut de Biologie Structurale l'IBS (LIM-IBS, Grenoble) ont supervisé ce travail.

Le projet a été initialisé par O. Dideberg du Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire de l'IBS (LCM-IBS) par l'identification de la séquence de Pmp23 qui pourrait coder pour une nouvelle enzyme de clivage du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*.

Avec l'aide d'A.M. Di Guilmi et O. Dideberg, j'ai réalisé les analyses de séquences présentées dans la publication n°I.

Afin d'évaluer le rôle cellulaire de Pmp23, j'ai effectué l'inactivation du gène *pmp23* dans la souche R6 de *S. pneumoniae* et construit les doubles mutants *lytA/pmp23* et *lytC/pmp23* à partir d'une souche *lytA/lytC/pmp23*, don de S. Guiral et J.P. Claverys (Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, Toulouse). J'ai procédé à toutes les études phénotypiques de croissance et de sensibilité à la pénicilline G des différentes souches ainsi qu'aux observations en microscopie optique. M. Arthur (LRMA, Université ParisVI, Centre de Recherches Biomédicales des Cordeliers) a déterminé la composition globale du peptidoglycane des souches sauvage et mutée *pmp23*. C. Frehel (Faculté Necker Enfants Malades, Paris) a réalisé les coupes de bactéries en microscopie électronique.

Dans le but de caractériser enzymatiquement Pmp23, les premiers clonages ainsi que la mise au point des essais de production et de purification de la protéine ont été réalisés par A.M. Di Guilmi. J'ai recherché l'activité d'hydrolase de cette protéine par des techniques de zymogramme. En collaboration avec B. Dublet du Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines de l'IBS (LSMP-IBS), j'ai réalisé les expériences de séparation de mucopeptides par RP-HPLC. B. Dublet a effectué toutes les analyses en MALDI-TOF de ces mucopeptides.

Les trois publications ont été rédigées avec l'aide d'A.M. Di Guilmi et T. Vernet.

## Matériels et méthodes

### Avertissement aux lecteurs

Ne seront développés dans cette partie que les protocoles expérimentaux non décrits dans les publications.

### I. Production des anticorps dirigés contre Pmp23

#### I.1. Production d'anticorps de lapin dirigés contre la protéine dénaturée H6-Pmp23\*

La forme soluble extracellulaire de Pmp23 (Pmp23\*) a été cloné en fusion avec une étiquette Histidine du côté C-terminal dans le vecteur pEt-20b(+) (Novagen). Le peptide signal *pelB* permet l'export dans le périplasme des cellules d'*E. coli* BL21(DE3).

L'ADN génomique d'une souche R6 de *S. pneumoniae* a été utilisé comme matrice pour amplifier *pmp23\** délété de la région cytoplasmique et de l'ancrage membranaire. Les oligonucléotides utilisés 5'-CGCGGATCCTACCGCGTTCATCAAGATGTCAAACAAGTCATGACC-3' et 5'-CCGCTCGAGCTAGCCAGATGTTGAAAAGAGAGTGAAACATTTGATGAT-3' contenant respectivement les sites de restrictions BamHI et XhoI (soulignés) ont servis à l'amplification PCR. Les produits amplifiés et digérés par BamHI et XhoI ont été clonés dans le vecteur pEt-20b(+). Le plasmide résultant pEt-20b(+)/*pmp23\** a été séquencé (Genome Express).

Une pré-culture d'une souche d'expression *E. coli* BL21(DE3) transformée avec le plasmide pEt-20b(+)/*pmp23\** a été utilisée pour inoculer (1:50) 1 litre de milieu Lennox-LB contenant 30 µg de kanamycine par ml. Lorsque la culture atteint une valeur de D.O.<sub>600</sub> proche de 1, l'expression de la protéine est induite par 1mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) pendant 16h00 à 16°C.

La protéine exprimée étant présente sous forme de corps d'inclusion, la purification s'est faite en conditions dénaturantes. Les cellules ont été centrifugées à  $6.000 \times g$  pendant 15 minutes et la lyse des cellules a été effectuée par sonication dans un tampon de 80 mL [50 mM Na acétate pH 5,3 ; 200 mM NaCl] avec un inhibiteur de protéases (Complete-EDTA free, Roche). Le lysat cellulaire a été centrifugé à  $39.200 \times g$  pendant 20 minutes puis le culot a été lavé successivement par [50 mM HEPES pH 7,2 ; 200 mM NaCl ; 0,5% Triton X-100] et par [50 mM HEPES pH 7,2 ; 2 M NaCl] avant d'être resuspendu et placé sous agitation pendant 16h00 à 4°C dans [50 mM HEPES pH 7,2 ; 200 mM NaCl ; 8 M urée]. Après centrifugation, le surnageant a été déposé sur une colonne chelating sepharose (Amersham Biosciences) équilibrée dans le tampon [50 mM HEPES pH 7,2 ; 200 mM NaCl ; 8 M urée ; 20 mM imidazole]. Après lavage par 10 volumes de résine, des étapes d'élutions de 45 mL de concentrations croissantes en imidazole (100 mM, 200 mM et 300 mM) ont été utilisées pour éluer Pmp23\*. La protéine éluee n'étant pas totalement pure, l'ensemble des fractions contenant Pmp23\* ont été rassemblées et concentrées jusqu'à un volume de 3 mL qui a entièrement été déposé sur un gel SDS - 15% PAGE. Le gel a ensuite été découpé au niveau de l'emplacement où a migré la protéine, écrasé et repris dans un tampon PBS 1X.

L'anti-sérum dirigé contre la protéine dénaturée H6-Pmp23\* a été produit chez le lapin (Elevage Scientifique des Dombes, France).

## **I. 2. Production d'anticorps de souris dirigés contre GST-Pmp23**

La purification de la protéine GST-Pmp23 est décrite dans la publication n°II. L'anti-sérum dirigé contre GST-Pmp23 a été obtenu à partir de souris (Hybrisère, Grenoble, France). Les anticorps de souris ont été immunopurifiés en deux étapes sur colonne « activated CH-Sepharose™ 4B » (Pharmacia Biotech) selon les instructions du fabricant : dans un premier temps, la protéine GST a été couplée de manière covalente à la résine. Après dépôt de l'antisérum de souris, la résine a été lavée avec un tampon [100 mM NaHPO<sub>4</sub> pH 7,8] jusqu'à ce que la DO<sub>280</sub> soit proche de 0. Les anticorps dirigés contre Pmp23 non accrochés à la résine (présents dans les 2 premiers volumes de colonne de tampon de lavage) ont été récupérés pour une seconde



immunopurification sur colonne « activated CH-Sepharose™ 4B » couplée à la protéine GST-Pmp23. Dans les deux cas, l'élution des anticorps s'est faite par changement de pH avec une solution de 200 mM glycine-HCl pH 2. Le pH de la solution d'anti-corps a été neutralisé à l'aide d'une solution de 2M Tris-HCl pH 8,8. Nous parvenons ainsi à séparer les anticorps dirigés contre la protéine GST (première immunopurification) des anticorps dirigés contre la protéine Pmp23 (seconde immunopurification).

### **I.3. Production d'anticorps de lapin dirigés contre des peptides synthétiques de Pmp23**

Les deux peptides F<sub>127</sub>IAQNGKENTLALAKQ<sub>142</sub> et T<sub>159</sub>YSYIHPISIFHGAELYVNG<sub>178</sub> issus de la séquence de Pmp23 ont été synthétisés, purifiés et utilisés pour obtenir des anticorps de lapin (Aneosystem, Strasbourg). Le choix des peptides est basé sur la comparaison de la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de Slt70 d'*E. coli* et du repliement tridimensionnel prédit de Pmp23 : les peptides ont été sélectionnés d'une part, pour leur localisation prédite en surface et d'autre part, pour leur arrangement structuré majoritairement en « coil ».

## **II. Western-blot**

Les protéines séparées par électrophorèse sur gel SDS-12% sont transférées sur une membrane « Trans-Blot Transfer Medium » (BioRad) à 50 volts pendant 1h00. La membrane est saturée dans un tampon [PBS 1X ; 0,3% Tween 20 ; 5% lait] pendant 1h00. La membrane est incubée 1h00 avec l'anticorps primaire dilué dans le même tampon entre 1/250 et 1/2.000 selon les cas. Après lavages avec un tampon [PBS 1X ; 0,3% Tween 20], l'anticorps secondaire de chèvre anti-Immunoglobuline G (IgG) de souris ou de lapin couplé à la peroxydase a été ajouté à la dilution 1/10.000 pendant 1h00. Après lavage, la révélation a été faite par chimioluminescence en utilisant le kit « ECL Westernblotting detection reagents ».

### III. Immunolocalisation

Un volume de 1 mL de culture cellulaire ayant atteint une D.O.<sub>620</sub> entre 0,3 et 0,4 est ajouté à 600 µL de solution de fixation de concentrations finales 2,5% (v/v) paraformaldéhyde, 0,03% (v/v) glutaraldéhyde, 30 mM sodium phosphate (pH 7,5) pendant 15 minutes à température ambiante puis 45 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans un tampon PBS 1X (centrifugation de 7.000 x g pendant 2 minutes) avant d'être resuspendues dans un tampon [50 mM glucose ; 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 10 mM EDTA] auquel du lysozyme de blanc d'œuf de poulet (Sigma) à une concentration de 0,1 mg/ml a été ajouté. Les cellules sont transférées sur des lames poly-L-lysine (Poly-Prep™ slides (Sigma)) et lavées deux fois avec un tampon PBS 1X. La perméabilisation des cellules s'effectue par trempage des lames pendant 5 minutes dans du méthanol à -20°C. Après lavage avec un tampon PBS 1X, les lames sont saturées par une solution de 5% BSA - PBS 1X pendant 2h00. Puis 100 µl d'anticorps primaires dilués à la concentration appropriée dans 5% BSA - PBS 1X sont ajoutés pendant 1h00. Après lavage, l'anticorps secondaire Cy3 ou Cy2 de chèvre anti-IgG de souris ou de lapin - (Jackson ImmunoResearch) est ajouté à la dilution 1/100 dans 5% BSA - PBS 1X pendant 1h00. L'ADN est marqué avec 2 µg/ml de 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (TEBU) ajouté à l'anti-corps secondaire. Les lames sont alors rincées avec un tampon PBS 1X et montées avec du Moviol. Les observations sont effectuées avec un objectif à immersion 100X sur un microscope à fluorescence Axioplan 2 (Zeiss) équipé avec une caméra axiocam MR et un logiciel d'exploitation axiovision (Zeiss).

### IV. Détermination de l'activité de clivage du peptidoglycane

Le protocole utilisé pour tester l'activité de GST-Pmp23 est adapté de celui décrit par De Jonge (de Jonge *et al.*, 1992) : entre 10 et 30 µg de GST-Pmp23 ont été utilisés pour digérer 600 µg de peptidoglycane de *S. aureus* (Sigma) dans un volume réactionnel de 600 µl. La réaction s'est déroulée sous agitation à 37°C, puis à 30°C, pendant deux fois 24h dans un tampon contenant [12,5 mM phosphate de sodium (pH 5,5) ; 10 mM chlorure de magnésium ; 0,02% azide de sodium et 0,5% Triton X-100]. Après une étape de chauffage à 100 °C pendant 5

minutes afin d'inactiver l'enzyme, et une centrifugation à 10.000 x g pendant 20 minutes, le surnageant contenant les mucopeptides solubles est récupéré. Le Triton X-100 a été retiré à l'aide de « Bio-Beads® SM Hydrophobic and Polar Interaction Adsorbents » (BioRad). La lysostaphine, à une concentration finale de 5 µg/ml, a été ajoutée au surnageant. La réaction s'est déroulée pendant 16h à 37°C sous agitation. Après 5 minutes de chauffage à 100°C, 600 µl d'une solution de 500 mM de borate de sodium pH9 ont été ajoutés. L'échantillon a été réduit par ajout de 1 mg de borohydrure de sodium (Sigma) (Glauner, 1988; Glauner *et al.*, 1988). Le pH a été ajusté à une valeur de 2 à l'aide d'une solution de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20%. Les mucopeptides produits au cours des réactions enzymatiques et réduits sont ensuite séparés par RP-HPLC.

#### **IV.1. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)**

L'équipement utilisé est un Integral™ 100Q System (PerSeptive Biosystems Framingham, MA). Deux colonnes Spheri-5 RP-18 (2,1 X 100 mm, 5 micron, Brownlee™ columns, Applied Biosystems, Foster City, CA) sont mises en tandem et protégées avec une pré-colonne Aquapore RP-18 (15 X 3,2 mm, 7 micron, Brownlee™ columns, Applied Biosystems, Foster City, CA). Deux gradients différents ont été effectués : la séparation a été faite à un débit de 0,1 ml/min en présence de 4,4 mM d'acide trifluoroacétique (Sigma) avec un gradient (0-20%) d'acétonitrile (Carlo Erba) pendant 80 minutes ou bien en présence de 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,5-2,8 avec un gradient (5-30%) méthanol pendant 150 minutes à 52°C (Arbeloa *et al.*, 2004; de Jonge *et al.*, 1992). La détection UV a été effectuée à 206 nm.

#### **IV.2. Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight)**

Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre de masse « Perseptive Biosystems Voyager Elite XL time of flight » (Framingham, MA), ayant un laser à azote d'une longueur d'onde de 337 nm. Les spectres de masse des ions positifs ont été acquis en utilisant un mode d'extraction linéaire avec une accélération de 20 kV, une tension de pré-grille de 94 %, une

tension du fil-guide de 0,15% et un délais de temps de 250 ns. Chaque spectre représente le résultat moyenné de 100 impacts du laser. Des aliquotes de 0,5 µl d'échantillons ont été mélangés à 0,5 µl d'une solution saturée d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (Sigma) préparé dans une solution de 50% (v/v) acétonitrile, 0,3% acide trifluoroacétique. Une calibration externe a été effectuée à partir de masses de peptides connus (calibration mixture 2 of the Sequazyme™ - Applied Biosystems, Foster City, CA). Les valeurs exprimées sont les masses moyennes et correspondent à l'ion  $[M+Na]^+$ .

Comme contrôles de réaction, le tampon de purification, la protéine GST et le lysozyme de blanc d'oeuf de poulet (Sigma), chacun utilisé à une concentration équivalente à celle de GST-Pmp23 ont été traités dans les mêmes conditions.

## Présentation de la publication n°I

Pagliero E, Dideberg O, Vernet T, Di Guilmi AM. (2005). The PECACE domain: a new family of enzymes with potential peptidoglycan cleavage activity in Gram-positive bacteria. BMC Genomics. 6(1):19.

### Objectif

L'étude bio-informatique présentée dans cette publication décrit l'identification du domaine PECACE (PEptidoglycan CARbohydrate Cleavage Enzyme) chez *S. pneumoniae*. Nous mettons ainsi en évidence une nouvelle famille d'hydrolases du peptidoglycane, contenant ce domaine, présente chez les bactéries à Gram positif.

### Identification d'un nouveau domaine PECACE probablement impliqué dans le clivage du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*

A partir de la séquence protéique de la transglycosylase lytique soluble, Slt70 d'*E. coli*, une recherche de domaine conservé a été restreinte à la famille *Bacilli*. Les séquences sortantes ont alors été utilisées pour rechercher des similarités de séquences en acides aminés dans le génome de *S. pneumoniae* : une seule séquence de 204 acides aminés a été identifiée. La topologie prédite de cette protéine est une courte région cytoplasmique, suivie d'une hélice transmembranaire puis d'un grand domaine extracellulaire qui contient le domaine catalytique PECACE.

Par prédiction à partir des structures tridimensionnelles disponibles, ce domaine adopterait un repliement tridimensionnel proche de ceux des domaines catalytiques de Slt70 et du lysozyme de type G du blanc d'œuf d'oie. Les résidus catalytiques et les motifs conservés probables du domaine PECACE ont pu être identifiés à partir de l'alignement de séquences entre le domaine PECACE et Slt70. Le résidu catalytique est probablement l'acide glutamique E<sub>61</sub>. La

thréonine T<sub>62</sub> et le motif D<sub>68</sub>VMQS participeraient à l'architecture du site actif. Le motif A<sub>117</sub>YNXG serait impliqué dans la liaison de la protéine au peptidoglycane. Ainsi, le domaine PECACE cliverait la même liaison du peptidoglycane que Slt70 et que le lysozyme de type G, à savoir, la liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  entre les résidus acide MurNAc et GlcNAc du peptidoglycane.

### **Mise en évidence d'une nouvelle famille d'hydrolases du peptidoglycane, contenant le domaine PECACE, chez les bactéries à Gram positif**

Le domaine PECACE a été recherché dans d'autres bactéries. Ce domaine est présent exclusivement dans le génome des bactéries à Gram positif.

Parmi les trente-cinq séquences protéiques, contenant le domaine PECACE, identifiées chez les bactéries à Gram positif, seize d'entre-elles présentent au moins un domaine supplémentaire. Le domaine PECACE a notamment été retrouvé associé au domaine CHAP et au domaine peptidase M37 dont la fonction enzymatique serait, dans les deux cas, une activité endopeptidase du peptidoglycane.

Une étude des gènes présents en amont et en aval des séquences nucléiques codant pour les protéines ayant un domaine PECACE, révèle une conservation de ceux-ci parmi les bactéries *Streptococci* indiquant que ce domaine est important pour ces bactéries à Gram positif.

### **Conclusion**

Un nouveau domaine, le domaine PECACE a été mis en évidence chez un grand nombre de bactéries à Gram positif. Comme son repliement tridimensionnel est prédit pour être similaire au domaine catalytique de la transglycosylase lytique, Slt70 d'*E. coli*, et du lysozyme de type G de blanc d'œuf d'oie, ce domaine pourrait participer au clivage de la liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  entre les résidus MurNAc et GlcNAc du peptidoglycane. Un argument supplémentaire en faveur d'une activité de clivage du peptidoglycane de ce domaine est conféré par le fait qu'il a été retrouvé associé à d'autres domaines connus pour hydrolyser le même substrat.

Une seule séquence possédant le domaine PECACE a été trouvée dans le génome de *S. pneumoniae*. La protéine de 23 kDa contenant ce domaine PECACE (P<sub>36</sub> to A<sub>140</sub>) a été appelée Pmp23 (Pneumococcal Membrane Protein). Cette hydrolase diffère de par sa topologie membranaire des hydrolases déjà identifiées chez *S. pneumoniae*. En effet, LytA, LytB, LytC et CbpD sont des protéines extracellulaires liant les résidus choline des acides teichoïques. PcsB, possédant un peptide signal d'export, est sécrétée. Ces protéines pourraient se localiser sur les couches les plus externes du peptidoglycane tandis que Pmp23, également localisé du côté extracellulaire, resterait proche de la membrane où se déroulent les étapes finales de synthèse du peptidoglycane. Ainsi, nous pouvons supposer que Pmp23 aurait un rôle physiologique, différent des autres hydrolases, au niveau du métabolisme du néo-peptidoglycane.

Research article

Open Access

## The PECACE domain: a new family of enzymes with potential peptidoglycan cleavage activity in Gram-positive bacteria

Estelle Pagliero<sup>1</sup>, Otto Dideberg<sup>2</sup>, Thierry Vernet\*<sup>1</sup> and Anne Marie Di Guilmi<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules Institute de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CEA-CNRS UMR 5075-UJF), 41 Rue Jules Horowitz 38027 Grenoble cedex 1, France and <sup>2</sup>Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CEA-CNRS UMR 5075-UJF), 41 Rue Jules Horowitz 38027 Grenoble cedex 1, France

Email: Estelle Pagliero - pagliero@ibs.fr; Otto Dideberg - otto@ibs.fr; Thierry Vernet\* - vernet@ibs.fr; Anne Marie Di Guilmi - diguilmi@ibs.fr

\* Corresponding author

Published: 17 February 2005

Received: 22 October 2004

BMC Genomics 2005, 6:19 doi:10.1186/1471-2164-6-19

Accepted: 17 February 2005

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/6/19>

© 2005 Pagliero et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** The metabolism of bacterial peptidoglycan is a dynamic process, synthases and cleavage enzymes are functionally coordinated. Lytic Transglycosylase enzymes (LT) are part of multienzyme complexes which regulate bacterial division and elongation. LTs are also involved in peptidoglycan turnover and in macromolecular transport systems. Despite their central importance, no LTs have been identified in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. We report the identification of the first putative LT enzyme in *S. pneumoniae* and discuss its role in pneumococcal peptidoglycan metabolism.

**Results:** Homology searches of the pneumococcal genome allowed the identification of a new domain putatively involved in peptidoglycan cleavage (PECACE, PEptidoglycan CArbohydrate Cleavage Ezyme). This sequence has been found exclusively in Gram-positive bacteria and gene clusters containing *pecace* are conserved among Streptococcal species. The PECACE domain is, in some instances, found in association with other domains known to catalyze peptidoglycan hydrolysis.

**Conclusions:** A new domain, PECACE, putatively involved in peptidoglycan hydrolysis has been identified in *S. pneumoniae*. The probable enzymatic activity deduced from the detailed analysis of the amino acid sequence suggests that the PECACE domain may proceed through a LT-type or goose lysozyme-type cleavage mechanism. The PECACE function may differ largely from the other hydrolases already identified in the pneumococcus: LytA, LytB, LytC, CBPD and PcsB. The multimodular architecture of proteins containing the PECACE domain is another example of the many activities harbored by peptidoglycan hydrolases, which is probably required for the regulation of peptidoglycan metabolism. The release of new bacterial genomes sequences will probably add new members to the five groups identified so far in this work, and new groups could also emerge. Conversely, the functional characterization of the unknown domains mentioned in this work can now become easier, since bacterial peptidoglycan is proposed to be the substrate.



## Background

The bacterial cell wall resists intracellular pressure and gives the bacterium its particular shape. Cell wall reinforcement is brought about by a strong scaffolding structure, the peptidoglycan, which is formed by glycan strands and peptide chains held together by covalent bonds, resulting in a mono- or multilayered network. The glycan strands are composed of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramyl (MurNAc) residues linked together by  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds. Peptides are covalently attached to the lactyl group of the muramic acid and their cross-linking results in the net structure of the peptidoglycan (Fig. 1a).

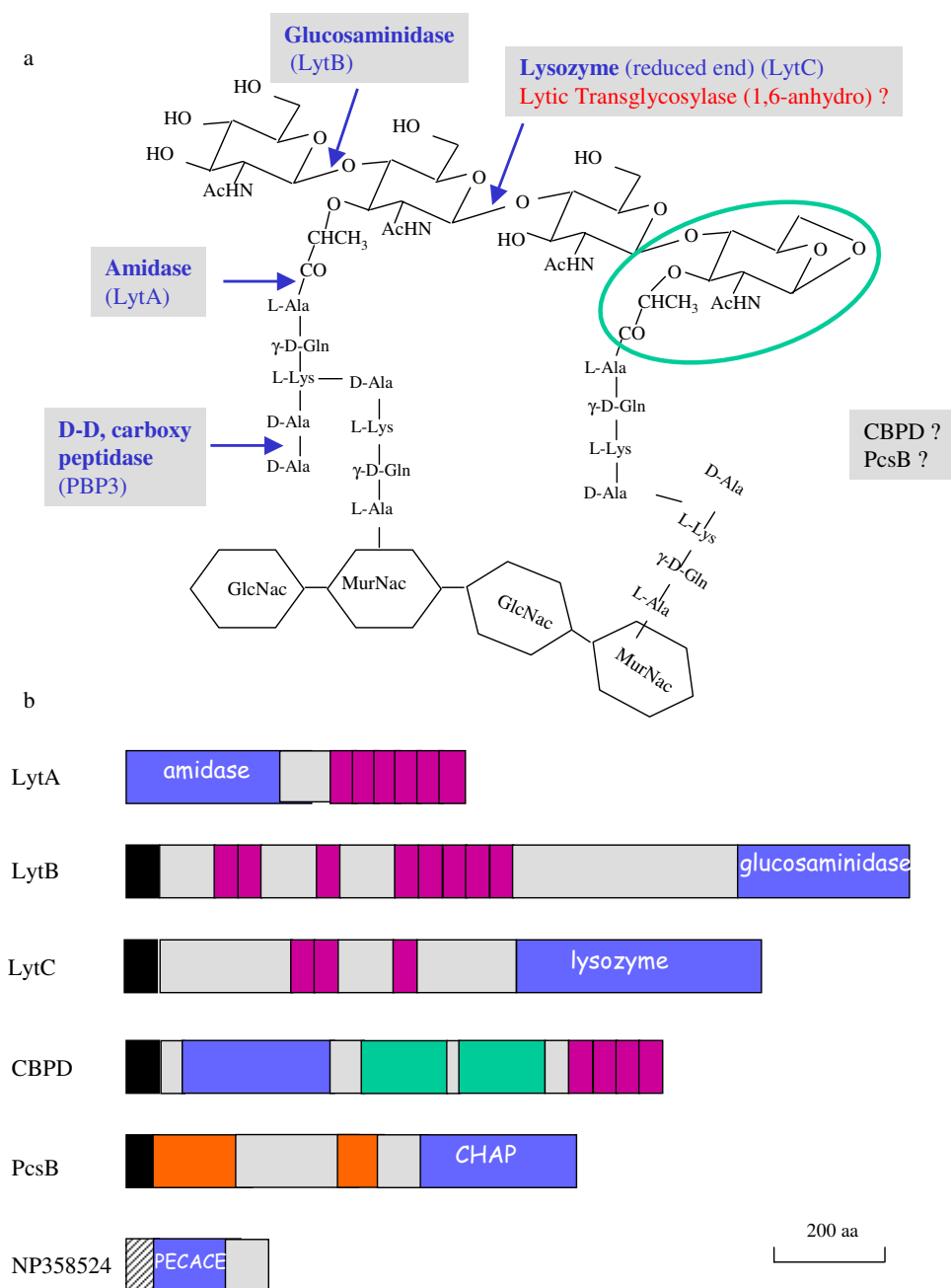
Peptidoglycan is synthesized in a multi-stage process. The first steps occur in the cytoplasm, where a set of enzymatic reactions gives rise to the assembly of the MurNAc-pentapeptide. This unit is in turn linked to the carrier undecaprenol lipid via a pyrophosphate group; afterwards the GlcNAc group is added, generating the lipid II precursor. The saccharidic and peptidic moieties of lipid II are subsequently exposed to the periplasmic space. At this stage, peptidoglycan biosynthesis involves polymerization of the glycan chains, catalyzed by glycosyltransferases [1] as well as interpeptide bridge formation performed by transpeptidases [2]. These two enzymatic reactions are resident on the extracellular domains of Penicillin-Binding Proteins (PBPs) which are membrane-associated molecules, present in all eubacteria [2].

Peptidoglycan metabolism is a dynamic process since this structure grows and divides in perfect synchronization with cell growth and division. Furthermore, it is well established that peptidoglycan is subject to maturation, turnover and recycling in Gram-negative bacteria [3]. To fulfill these processes, it is expected that peptidoglycan cleavage enzymes must exert their functions in coordinated action with PBPs. Indeed, a large range of different peptidoglycan hydrolases have been identified in numerous bacterial species and specific peptidoglycan hydrolases exist for almost each covalent bond [3] (Fig. 1a). The polysaccharidic component of peptidoglycan is the target of several hydrolases: the  $\beta$ -1,4 glycosidic bond between MurNAc and GlcNAc residues is cleaved by lysozyme and by lytic transglycosylases (LT), the  $\beta$ -1,4 glycosidic bond between GlcNAc and MurNAc is hydrolyzed by glucosaminidases and amidases are responsible for the cleavage of the MurNAc-L-alanine bond (Fig. 1a).

Lysozyme and LT enzymes cleave the same  $\beta$ -1,4-MurNAc-GlcNAc bond but generate different reaction products: while lysozymes catalyze a hydrolytic reaction, LTs cleave the  $\beta$ -glycosidic linkage with the concomitant formation of 1,6-anhydromuramyl residues, blocking the reducing end of the glycan strands. The significance of the

ring structure is not known but it has been speculated that the bond energy may be utilized for glycan strand rearrangements. In addition, the 1,6-anhydro ring may also be considered as a specific product of peptidoglycan turnover. Despite the lack of understanding of the physiological function of anhydromuropeptide product, LT enzymes must play a significant cellular role. Indeed, it has been observed that deletions of genes encoding LT proteins lead to *E. coli* and *Neisseria meningitidis* with altered cell separation phenotypes, indicating that LTs cleave septal peptidoglycan [4,5]. Macromolecular transport systems (secretion types II, III, IV and IV pilus synthesis) of Gram-negative bacteria contain LT enzymes, suggesting that peptidoglycan hole formation (essential for transport functions) is specifically performed by this enzyme family [6]. As mentioned above, the enlargement of the bacterial stress-bearing peptidoglycan structure requires the well coordinated action of synthases (PBPs) and hydrolase enzymes. The "three-for-one" growth mechanism described by Höltje proposes that a triplet of glycan strands cross-linked to each other (resulting from PBPs synthesis) is attached to the peptidoglycan layer. Subsequently, the docking strand is removed by hydrolases resulting in the insertion of the peptidoglycan triplet. The hydrolases involved in such multienzyme complexes are endopeptidases and LT enzymes [3]. This hypothesis is supported by experimental data as LT and PBPs could be co-purified from *E. coli* extracts [7-9]. In conclusion, LT enzymes play an important cellular role in diverse aspects of cell biology as expected from their presence in a very wide range of eubacteria as well as archaeobacteria [3,10,11].

Surprisingly, no such LT enzyme has been identified to date in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, the causative agent of ear infections in children, as well as meningitis and pneumonia. The pattern of peptidoglycan hydrolases in this Gram-positive bacteria includes, besides a D, D-carboxypeptidase, five glycan strand cleaving enzymes (Fig 1b). Four of these are surface-exposed proteins harboring Choline-Binding Domains which are non-covalently bound to choline residues present on cell wall pneumococcal teichoic and lipoteichoic acids [12-14]. The Choline-Binding Proteins (CBPs) catalyzing peptidoglycan hydrolysis are LytA, LytB, LytC and potentially CBPD (Fig 1b). LytA is an amidase and also appears as an autolytic enzyme, causing bacteriolysis when acting in an uncontrolled manner [15]. LytB is a glucosaminidase involved in cell separation as *lytB* mutants form very long chains of over 100 cells [16]. LytC is a lysozyme with an autolytic behavior at 30 °C [17]. Finally, CBPD and PcsB contain a CHAP domain (Cysteine, Histidine-dependent amidohydrolase/peptidase) predicted to hydrolyse the peptidoglycan in pneumococcus, but definitive biochemical data are still lacking [18-20].

**Figure 1**

**Schematic representation of peptidoglycan and of cleavage enzymes in *S. pneumoniae*.** (a) Scheme of the pneumococcal peptidoglycan, indicating the chemical bonds cleaved by identified hydrolases in blue. The MurNAc residue containing the 1, 6-anhydro bond resulting from LT reaction is in a green circle. The putative LT pneumococcal enzyme appears in red, while enzymes CBPD and PcsB for which no enzymatic specificity is yet characterized are in black. (b) Topological representation of the glycan strand hydrolases described in *S. pneumoniae*. Black and hatched boxes indicate the signal peptide and the transmembrane anchor, respectively. The blue boxes illustrate the respective enzymatic active domains. Purple rectangles correspond to the Choline-Binding repeats. Green and orange boxes correspond to SH3b and coiled-coil regions, respectively. The topology was designed with the help of SMART server [39].

Our interest in the biology of *S. pneumoniae* led us to investigate the presence of LT enzymes in this bacteria. Homology searches of enzyme sequences within the pneumococcus genome using bioinformatics tools allowed the identification of a new domain harboring motifs that infer potential peptidoglycan cleavage activity. For this reason we named this domain PECACE (PEptidoglycan CARbohydrate Cleavage Enzyme). This domain sequence was found exclusively in Gram-positive bacterial species, suggesting a significant cellular role. Finally, the PECACE domain is in some instances found in association with other domains, known to catalyze peptidoglycan hydrolysis: this observation reinforces the predicted function of PECACE as participating in peptidoglycan cleavage and represents another example of multifunctional proteins involved in peptidoglycan metabolism.

## Results and discussion

### Identification of a protein harboring the PECACE domain in *S. pneumoniae*

The C-terminal domain of *Escherichia coli* Slt70 (Soluble Lytic Transglycosylase) has a lysozyme-like fold and its amino acid sequence was employed in a search of Bacilli genomes within the NCBI Conserved Domain Search server [11,21-23]. Thirty-four Slt70-homologue sequences were retrieved using an inclusion threshold of 0.01. None of these sequence originated from the *S. pneumoniae* translated genome. Subsequently, each of these 34 sequences was compared with the non-redundant protein database using PSI-BLAST with a E-value threshold of 0.005 and 5 sequences showed significant matches with a unique protein in *S. pneumoniae*. This sequence (accession numbers NP358524, gi:15902974) contains 204 amino acids: the first 21 amino acids are predicted to form a transmembrane anchor and the subsequent 192-residue region is putatively exposed to the extracellular space (Fig. 1b). This *S. pneumoniae* NP358524 sequence has been tested as a pneumococcal vaccine antigen on the basis of preliminary screens for novel vaccine candidates [24].

A three-dimensional fold prediction of the *S. pneumoniae* NP358524 protein was performed with the 3D-PSSM server [25] which identified two matches: *E. coli* Slt70 (d1qsaa2, E-value:10<sup>-7</sup>) and LysG (G-type goose lysozyme, d1531, E-value:10<sup>-3</sup>). The sequence alignment between NP358524 and Slt70 is shown in Fig. 2, defining the PECACE domain in the pneumococcal protein. The secondary structures are also reported, based on three-dimensional structures of Slt70 and on computational predictions for PECACE and suggest that the latter is highly  $\alpha$ -helical (Fig. 2). It is of note that both Slt70 and LysG are highly similar, and both lack the catalytic aspartate residue commonly found in the active site of lysozymes [10,11,21,22]. Therefore, the PECACE domain of the NP358524 sequence appears to belong to this group

of bacterial lysozymes, characterized by the absence of an aspartate residue in the catalytic site and is part of the Glycoside Hydrolase family 23 based upon CAZy classification <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>. The catalytic acid residue in the PECACE domain is most probably Glu61 since it aligns with the catalytic Glu478 residue in the Slt70 sequence (Fig. 2). The serine residue following the catalytic glutamate and the GLMQI/V motif are essential for active-site architecture and are conserved between Slt70 and LysG. In the PECACE sequence, a threonine residue follows the catalytic glutamate and the GLMQI/V motif differs since the corresponding sequence is D(68)VMQS (Fig. 2). Finally, the second motif AYNxG which has been shown to be involved in the interaction with the substrate for Slt70 (A551YNxG) is well conserved in the PECACE sequence (A117YNxG).

Based on this sequence analysis, we infer that the *S. pneumoniae* NP358524 protein, through its PECACE domain, probably catalyzes the peptidoglycan cleavage of the  $\beta$ -1,4-MurNAc-GlcNAc bond by employing Glu61 as the catalytic residue.

### Identification of the PECACE domain in Gram-positive bacteria

The 204 amino acid sequence from *S. pneumoniae* NP358524, containing the PECACE domain, was used as a PSI-BLAST search query. In total, 29 distinct proteins, all from Gram-positive bacteria, were identified (E-value: 10<sup>-5</sup>) and no sequences from Gram-negative bacteria were retrieved. These sequences were aligned with ClustalW and manually edited. A conserved pattern could be extracted from this alignment: E- [ST]-X-G-X(1,16)-D-X-M-Q- [SA]- [SA]-E- [SG] which was used to search for additional sequences, but no new sequence could be detected from databases, even with a degenerated pattern. PSI-BLAST performed through the GOLD server led to the identification of 10 new sequences from Gram-positive bacteria [26]. In summary, out of the about 50 Gram-positive bacteria for which the whole genome sequence is available, 34 of them contain at least one protein harboring the PECACE domain. The final alignment of these sequences with the *S. pneumoniae* PECACE domain is shown in Fig. 3. The putative catalytic glutamate residue, Glu61 in the *S. pneumoniae* PECACE domain, is conserved in all sequences and the following residue is a Ser or Thr in accordance with Slt70 and LysG patterns. In addition, the D(68)VMQS motif in the *S. pneumoniae* PECACE domain is also well represented in the large majority of sequences with the consensus sequence DI/VMQSSES. Finally, the second motif AYNxG is also conserved while the Ala residue is often replaced by a Ser. In conclusion, the features identified in the *S. pneumoniae* PECACE domain regarding the potential enzymatic properties of

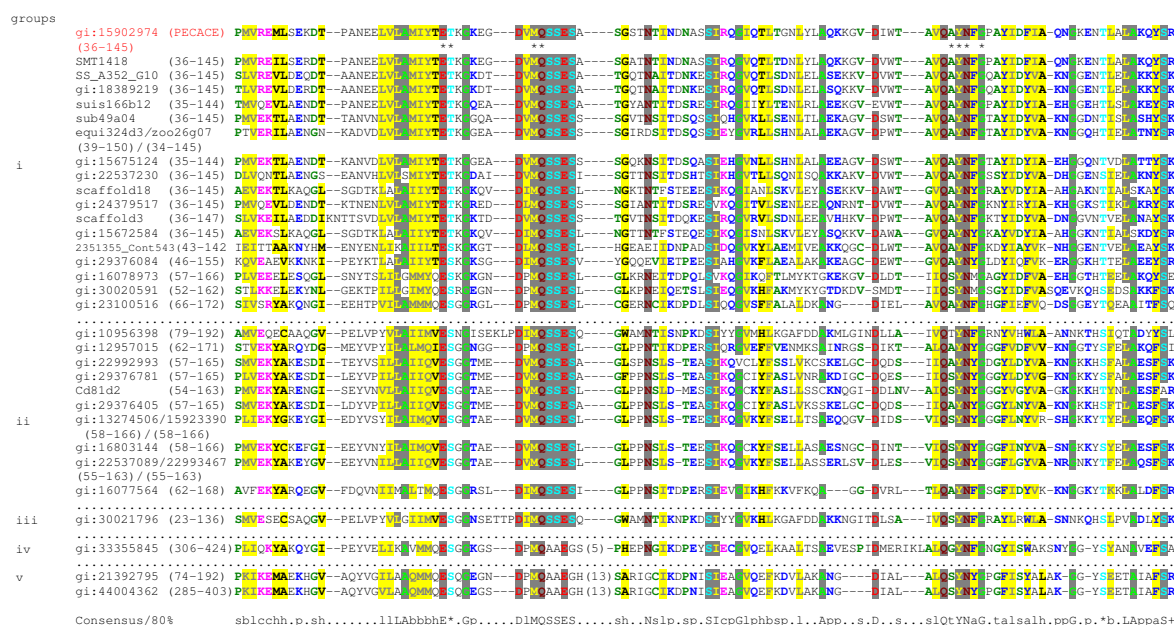
### Figure 2

peptidoglycan polysaccharide cleavage are also shared by the similar PECACE domains in Gram-positive bacteria.

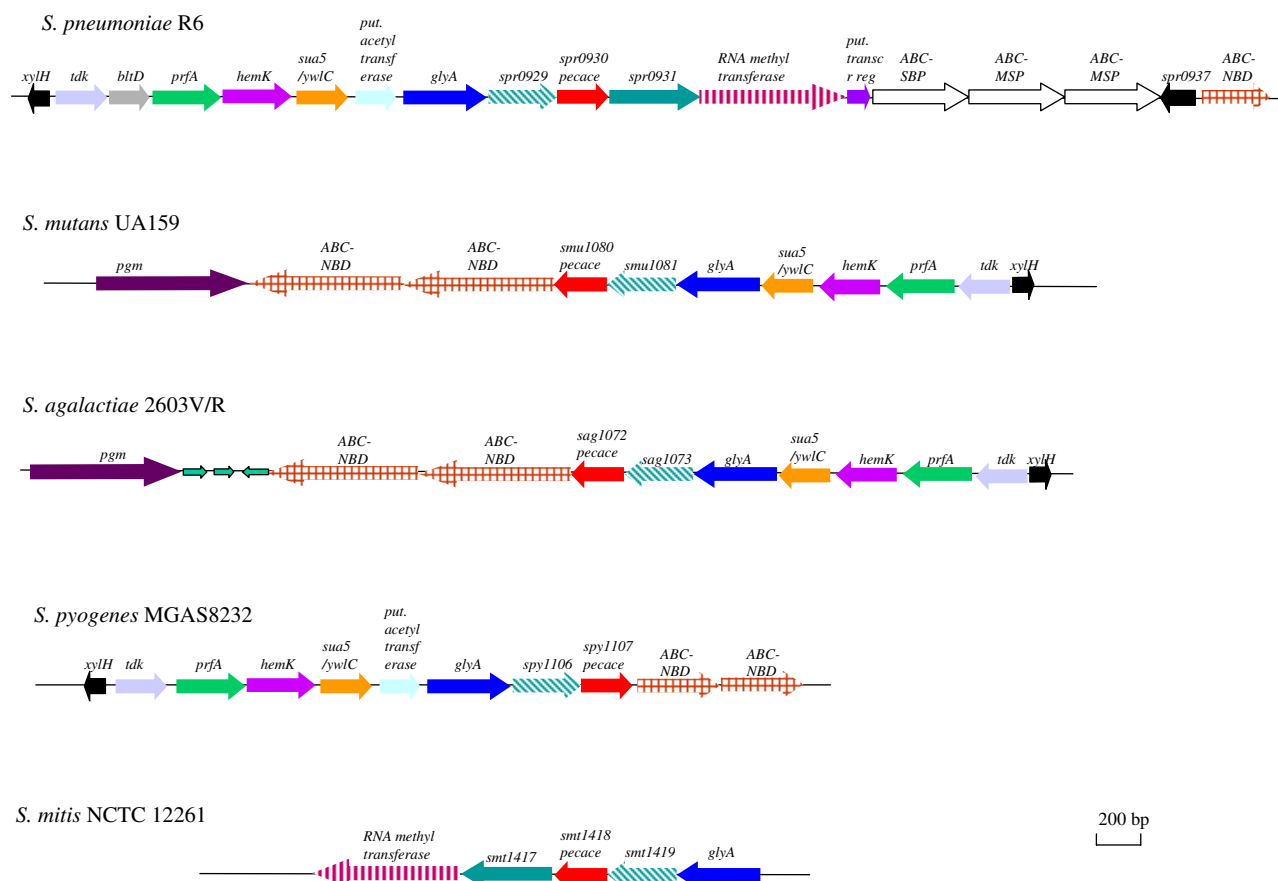
The genomic organization of *pecace* genes has been analyzed in a variety of Gram-positive bacteria and a conserved distribution was observed in various streptococci species (Fig. 4). This feature indicates that genetic transfer of the whole cluster may have occurred within the streptococci family, providing further evidence regarding the significant importance of the PECACE domains in bacterial physiology. However, the pneumococcal cluster is more related to the *S. mitis* one than to *S. mutans*, *S. agalactiae* and *S. pyogenes* ones, while clusters of the latter three species are related to each other. Genes located upstream and downstream of *pecace* are in some instances well characterized but the function of the corresponding proteins could not bring any clues about the role of PECACE, nor any evidence on *pecace* gene transcription. However, *pecace* is in all cases found in association with the same

gene (whose locus name in *S. pneumoniae* is spr0929) but no information about the function of the protein encoded by this locus is available in databases. Transcriptional analysis of these two genes may bring informations about their potential co-regulation, a first stage in deciphering cellular function.

The PECACE domain is found in a large range of protein architectures, commonly associated with other peptidoglycan hydrolases, suggesting that these proteins have multiple peptidoglycan cleavages activities (Fig. 5). The identification of proteins displaying the PECACE domain was carried out using NCBI Conserved Domain Search and Pfam servers. In addition, prediction of membrane anchoring was performed with the DAS-Transmembrane Prediction server while extracellular secretion of the protein was deduced from the identification of a signal peptide.

**Figure 3**

**Sequence alignment of PECACE domains identified in Gram-positive bacteria.** Multiple sequence alignment was constructed using ClustalV. The lengths of the insertions in the sequences are shown in parentheses. The sequences are denoted by their GenBank Identifier (gi). The domain limits are indicated by the residue positions (first-end). The amino acids identified as catalytic or involved in ligand recognition are marked with asterisks under PECACE sequence. Alignments are coloured using the CHROMA tool using default parameters [40]. Full sequence details, group (i): *Streptococcus pneumoniae* R6 (gi:15902974), *Streptococcus mitis* NCTC 12261 (§SMT1418), *Streptococcus sanguinis* SK36 (&SS\_A352\_G10), *Streptococcus gordonii* (gi:18389219), *Streptococcus suis* P1/7 (suis166b12), *Streptococcus uberis* 0140J (sub49a04), *Streptococcus equi* (equi324d3), *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (zoo26g07), *Streptococcus pyogenes* M1 GAS (gi:15675124), *Streptococcus agalactiae* 2603V/R (gi:22537230), *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* SK11 (scaffold18), *Streptococcus mutans* UA159 (gi:24379517), *Streptococcus thermophilus* LMD-9 (scaffold3), *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (gi:15672584), *Enterococcus faecium* DO (2351355\_Cont543), *Enterococcus faecalis* V583 (gi:29376084), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (gi:16078973), *Bacillus cereus* ATCC 14579 (gi:30020591), *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 (gi:23100516), group (ii): *Bacillus anthracis*: (pXO2-08) (gi:10956398), *Enterococcus faecalis*: (pRE25) (gi:12957015), *Enterococcus faecium* (gi:22992993), *Enterococcus faecalis* V583 (gi:29376781), *Clostridium difficile* 630 (Cd81d2), *Enterococcus faecalis* V583 (gi:29376405), *Clostridium perfringens* (gi:13274506), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu50 (gi:15923390), *Listeria monocytogenes* EGD-e (gi:16803144), *Streptococcus agalactiae* 2603V/R (gi:22537089), *Enterococcus faecium* (gi:22993467), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (gi:16077564), group (iii): *Bacillus cereus* ATCC 14579 (gi:30021796), group (iv): *Enterococcus faecalis* BM4518 (gi:33355845), group (v): *Bacillus anthracis* str. A2012: (pXO1) (gi:21392795), *Bacillus cereus* ATCC 10987: (pBc10987) (gi:44004362).

**Figure 4**

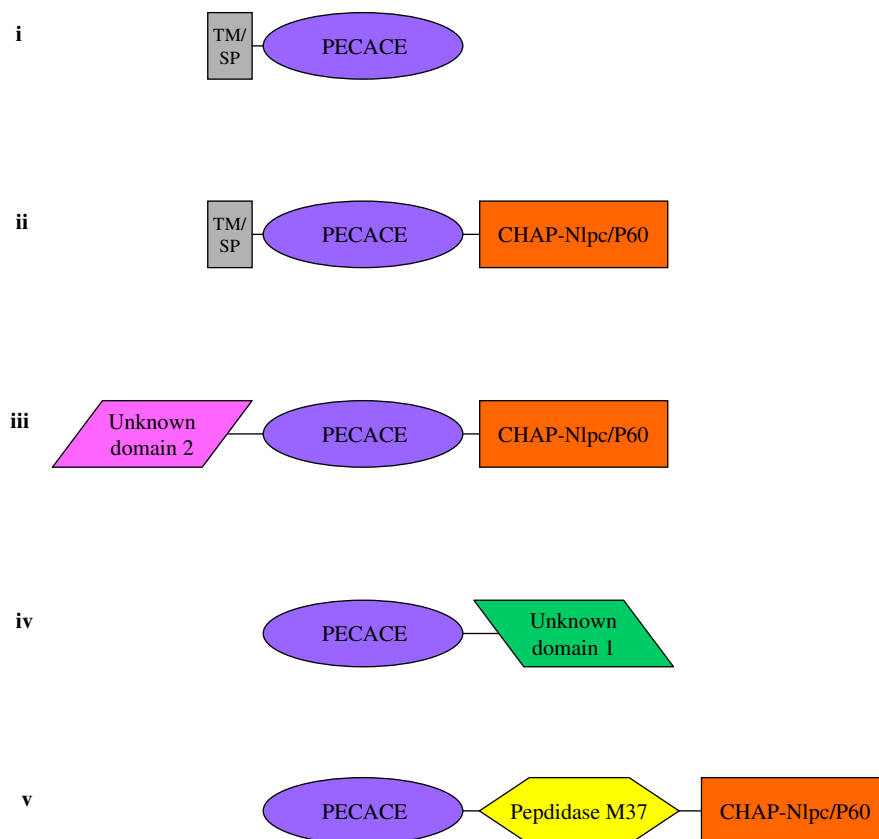
**Schematic representation of the gene cluster containing *pecace* in *Streptococci* species.** The coding regions and their direction of transcription are indicated by arrows. Gene names are given on top of the corresponding region.

PECACE-containing proteins appear to fall into 5 main categories (Fig. 5): (i) those which display no additional domain, (ii) CHAP-Nlpc/P60 as the associated group, (iii) CHAP-Nlpc/P60 and an unknown domain as associated groups, (iv) domains with no ascribed functions and finally (v) CHAP-Nlpc/P60 and M37 peptidase as associated groups.

The 19 proteins which contain only the PECACE domain belong to group (i) and harbor either a signal peptide or a transmembrane helix (as for the *S. pneumoniae* protein), leading in both cases to cell surface expression.

The CHAP-Nlpc/P60 domain is commonly associated with the PECACE domain in different modular organiza-

tions, namely in groups (ii), (iii), and (v) [18,19,27]. The CHAP domain has been recently described as a Cysteine, Histidine-dependent Amidohydrolase/Peptidase and it has been proposed to hydrolyse peptidoglycan containing  $\gamma$ -glutamyl [18,19]. Indeed, proteins such as *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase and D-alanyl-glycyl endopeptidase have been described as CHAP-containing enzymes [18,19]. However, while the substrate and the reaction mechanism have not been yet experimentally characterized for the CHAP domain, its role in peptidoglycan hydrolysis is inferred from its presence in multifunctional proteins recognizing peptidoglycan as substrate. Recently, hydrolytic activity of peptidoglycan has been attributed to the CHAP-containing protein PcsB in *S. pneumoniae* due to abnormal and uncontrolled cell wall

**Figure 5**

**Domain architecture of PECACE proteins.** The domain architecture of the proteins containing the PECACE domain was organized according to searches with NCBI Conserved Domain Search server against Pfam database: CHAP/Nlpc-P60 (Pfam: PF05257/PF00877), M37 peptidase (Pfam: PF01551), unknown domain 1 (gi: 33355845) and unknown domain 2 (gi: 30021796). The size of the domains is not respected in these representations.

synthesis at misplaced septa and formation of long cells in *pcsB* deleted mutant strains [20]. Proteins from group (ii) are expressed at the cell surface through a transmembrane anchor or are secreted, 12 members have been identified with this topology. Only one sequence (AAQ16265, gi:33355845) from *Enterococcus faecalis* BM4518 is part of the group (iii), and no function could be identified for the N-terminus domain preceding the PECACE domain. However the former domain is Lys-rich (14%) suggesting an electrostatic interaction with the peptidoglycan as proposed for *B. subtilis* endopeptidase [28]. Group (iv) is composed of an unique sequence from *B. cereus* ATCC 14579 (NP 833427, gi:30021796). Neither a signal peptide nor a transmembrane anchor have been detected.

Furthermore, the domain of unknown function, which is different from the ones identified in groups (iii) and (v) is present in other multimodular proteins of *B. cereus*, in association with peptidoglycan hydrolysis enzymes. Finally, two sequences share the architecture defining the group (v) which harbor CHAP-Nlpc/P60 and Peptidase M37 domains [29]. Members of the Peptidase M37 family are generally glycylglycine endo-metalloproteases; the archetypal member is the lysostaphin enzyme from *Staphylococcus* species which cleaves the pentaglycine bridge in the peptidoglycan [30]. One group (v) protein (NP 652875, gi:21392795) is encoded by *Bacillus anthracis* plasmid pXO1 and is required for synthesis of various anthrax toxin proteins [31]; this sequence has neither a



signal peptide nor a transmembrane region. The second sequence of group (v) is located on *Bacillus cereus* ATCC 10987 plasmid pBc10987 (NP 982030, gi:44004362) and contains, in addition to CHAP-Nlpc/P60, Peptidase M37 and PECACE domain as well as an extra sequence to which no function has been attributed but with significant similarity with a *B. anthracis* plasmid pXO1 sequence (NP 652874, gi:21392794) [32].

## Conclusions

In summary, a new domain named PECACE, putatively involved in peptidoglycan cleavage has been identified in *S. pneumoniae*. The probable enzymatic activity deduced from the detailed analysis of the amino acid sequence suggests a LT-type or goose lyzosome-type mechanism; we are currently characterising the enzymatic properties and cellular role of the PECACE domain from *S. pneumoniae*. This new putative pneumococcal peptidoglycan cleavage enzyme differs largely from the other hydrolases already identified in this bacteria. Indeed, LytA, LytB, LytC and CBPD proteins are all bound to the cell wall choline residues and thus expressed at the cell surface. The presence of a signal peptide within the amino acid sequence of PcsB suggests that it is either exposed on the cell surface or secreted. On the contrary, the pneumococcal NP358524 protein displaying the PECACE domain is embedded in the cytoplasmic membrane by a hydrophobic helix. The physiological role of this membranous peptidoglycan cleavage enzyme might differ from the other peptidoglycan hydrolysing enzymes.

Interestingly, the PECACE domain has only been found in Gram-positive bacteria. It is tempting to speculate that the multilayered structure of Gram-positive peptidoglycan relates to the PECACE putative activity.

The architecture of multimodular proteins containing the PECACE domain is another example of the pattern of multiple activities harbored by many peptidoglycan hydrolases, probably needed for the regulation of peptidoglycan metabolism. The release of new bacterial genomes sequences will probably add new members that will complete the five groups identified so far in this work and new groups could also emerge. Conversely, the functional characterization of the unknown domains mentioned in this work should now be easier, as their substrate, the peptidoglycan, is now identified.

## Methods

The non-redundant database of protein sequences (National center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda) and whole bacterial genomes sequences <http://www.genomesonline.org> [26] was searched using BLASP and PSI-BLAST programs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> with (E) value threshold of 0.005 [33]. Multiple

alignments were constructed with ClustalW program <http://npsa-pbil.ibcp.fr> [34] followed by manual correction based on PSI-BLAST results. Protein fold recognition through 3D-profiles was searched using 3D-PSSM server <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk> [25]. Conserved (and degenerated) amino acid patterns was designed and searched against non-redundant database of protein sequences <http://npsa-pbil.ibcp.fr>. Identification of domains associated with PECACE proteins was realized using NCBI Conserved Domain Search <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> [35] and Pfam servers <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam> [36]. Finally, prediction of transmembrane anchor and secretory signal peptide were performed with DAS server <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html>; and SignalP-2.0 servers <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html>; respectively [37,38].

## Authors' contributions

OD conceived of the study and participated in the sequences alignment. EP carried out the sequences analysis and the writing of the manuscript with AMDG. TV coordinated the study. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

This work was supported by the European Commission grant LSMH-CT-COBRA 2003-503335. EP is a recipient of a CEA CFR fellowship. We are grateful to Dr Andréa Dessen for constructive comments and critical review of the manuscript.

## References

1. van Heijenoort J: **Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan.** *Glycobiology* 2001, **11**:25R-36R.
2. Goffin C, Ghuysen JM: **Biochemistry and Comparative Genomics of SxxK Superfamily Acyltransferases Offer a Clue to the Mycobacterial Paradox: Presence of Penicillin-Susceptible Target Proteins versus Lack of Efficiency of Penicillin as Therapeutic Agent.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, **66**:702-738.
3. Höltje JV: **Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of Escherichia coli.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, **62**:181-203.
4. Adu-Bobie J, Lupetti P, Brunelli B, Granoff D, Norais N, Ferrari G, Grandi G, Rappuoli R, Pizza M: **GNA33 of Neisseria meningitidis is a lipoprotein required for cell separation, membrane architecture, and virulence.** *Infect Immun* 2004, **72**:1914-1919.
5. Heidrich C, Ursinus A, Berger J, Schwarz H, Höltje JV: **Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2002, **184**:6093-6099.
6. Koraimann G: **Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria.** *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**:2371-2388.
7. Vollmer W, von Rechenberg M, Höltje JV: **Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBPIB, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1999, **274**:6726-6734.
8. Schiffer G, Höltje JV: **Cloning and characterization of PBPIc, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1999, **274**:32031-32039.
9. Romeis T, Höltje JV: **Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1994, **269**:21603-21607.



10. Blackburn NT, Clarke AJ: **Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases.** *J Mol Evol* 2001, **52**:78-84.
11. Dijkstra BW, Thunnissen AM: **'Holy' proteins. II: The soluble lytic transglycosylase.** *Curr Opin Struct Biol* 1994, **4**:810-813.
12. Hoskins JA, Arnold WE Jr, Arnold J, Blaszcak LC, Burgett S, DeHoff BS, Estrem ST, Fritz L, Fu DJ, Fuller W, Geringer C, Gilmour R, Glass JS, Khoja H, Kraft AR, Lagace RE, LeBlanc DJ, Lee LN, Lefkowitz EJ, Lu J, Matsushima P, McAhren SM, McHenney M, McLeaster K, Mundy CW, Nicas TI, Norris FH, O'Gara M, Peery RB, Robertson GT, Rockey P, Sun PM, Winkler ME, Yang Y, Young-Bellido M, Zhao G, Zook CA, Baltz RH, Jaskunas SR, Rostek PR Jr, Skatrud PL, Glass JI: **Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6.** *J Bacteriol* 2001, **183**:5709-5717.
13. Tettelin H, Nelson K, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, Heidelberg J, DeBoy RT, Haft DH, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Kolonay JF, Nelson WC, Peterson JD, Umayam LA, White O, Salzberg SL, Lewis MR, Radune D, Holtzapple E, Khouri H, Wolf AM, Utterback TR, Hansen CL, McDonald LA, Feldblyum TV, Angiuoli S, Dickinson T, Hickey EK, Holt IE, Loftus BJ, Yang F, Smith HO, Venter JC, Dougherty BA, Morrison DA, Hollingshead SK, Fraser CM: **Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*.** *Science* 2001, **293**:498-506.
14. Fernandez-Tornero C, Lopez R, Garcia E, Gimenez-Gallego G, Romero A: **A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA.** *Nat Struct Biol* 2001, **8**:1020-1024.
15. Ronda C, Garcia JL, Garcia E, Sanchez-Puelles JM, Lopez R: **Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the lytA gene in *Streptococcus pneumoniae*.** *Eur J Biochem* 1987, **164**:621-624.
16. De Las Rivas B, Garcia JL, Lopez R, Garcia P: **Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase.** *J Bacteriol* 2002, **184**:4988-5000.
17. Garcia P, Paz Gonzalez M, Garcia E, Garcia JL, Lopez R: **The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains.** *Mol Microbiol* 1999, **33**:128-138.
18. Rigden DJ, Jedrzejewski MJ, Galperin MY: **Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of gamma-D, L-glutamate-specific amidohydrolases.** *Trends Biochem Sci* 2003, **28**:230-234.
19. Bateman A, Rawlings ND: **The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases.** *Trends Biochem Sci* 2003, **28**:234-237.
20. Ng WL, Kazmierczak KM, Winkler ME: **Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator.** *Mol Microbiol* 2004, **53**:1161-1175.
21. Blackburn NT, Clarke AJ: **Assay for lytic transglycosylases: a family of peptidoglycan lyases.** *Anal Biochem* 2000, **284**:388-393.
22. Thunnissen AM, Isaacs NW, Dijkstra BW: **The catalytic domain of a bacterial lytic transglycosylase defines a novel class of lysozymes.** *Proteins* 1995, **22**:245-258.
23. Thunnissen AM, Dijkstra AJ, Kalk KH, Rozeboom HJ, Engel H, Keck W, Dijkstra BW: **Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography.** *Nature* 1994, **367**:750-753.
24. Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE, Erwin AL, Kunsch C, Choi GH, Barash SC, Rosen CA, Masure HR, Tuomanen E, Gayle A, Brewah YA, Walsh WV, Barren P, Lathigra R, Hanson M, Langermann S, Johnson S, Koenig S: **Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection.** *Infect Immun* 2001, **69**:1593-1598.
25. Kelley L, MacCallum R, Sternberg MJE: **Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM.** *J Mol Biol* 2000, **299**:499-520.
26. Bernal A, Ear U, Kyripides N: **Genomes OnLine Database (GOLD): a monitor of genome projects world-wide.** *Nucleic Acid Res* 2001, **29**:126-127.
27. Anantharaman V, Aravind L: **Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes.** *Genome Biol* 2003, **4**:R11.
28. Margot P, Wahlen M, Gholamhoseinian A, Piggot P, Karamata D, Gholamhoseinian A: **The lytE gene of *Bacillus subtilis* 168 encodes a cell wall hydrolase.** *J Bacteriol* 1998, **180**:749-752.
29. Ichimura T, Yamazoe M, Maeda M, Wada C, Hiraga S: **Proteolytic activity of YibP protein in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 2002, **184**:2595-2602.
30. Lange R, Hengge-Aronis R: **The nlpD gene is located in an operon with rpoS on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation.** *Mol Microbiol* 1994, **13**:733-743.
31. Xie L, Chatterjee C, Balsara R, Okeley NM, van der Donk WA: **Heterologous expression and purification of SpaB involved in subtilin biosynthesis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **295**:952-957.
32. Rasko DA, Ravel J, Okstad OA, Helgason E, Cer RZ, Jiang L, Shores KA, Fouts DE, Tourasse NJ, Angiuoli SV, Kolonay J, Nelson WC, Kolsto AB, Fraser CM, Read TD: **The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:977-988.
33. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
34. Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive-multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673-4680.
35. Marchler-Bauer A, Anderson JB, DeWeese-Scott C, Fedorova ND, Geer LY, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Jacobs AR, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Madej T, Marchler GH, Mazumder R, Nikolskaya AN, Panchenko AR, Rao BS, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Vasudevan S, Wang Y, Yamashita RA, Yin J, Bryant SH: **CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:383-387.
36. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer ELL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR: **The Pfam Protein Families Database.** *Nucleic Acids Research* 2004, **32**:D138-D141.
37. Cserzo M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A: **Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method.** *Protein Eng* 1997, **10**:673-676.
38. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G: **Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.** *Protein Engineering* 1997, **10**:1-6.
39. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting C: **SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:5857-5864.
40. Goodstadt L, Ponting C: **CHROMA: consensus-based colouring of multiple alignments for publication.** *Bioinformatics* 2001, **17**:845-846.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
http://www.biomedcentral.com/info/publishing\_adv.asp



## Présentation de la publication n°II

Pagliari E, Dublet B, Frehel C, Dideberg O, Vernet T, Di Guilmi AM. The inactivation of the new peptidoglycan hydrolase Pmp23 leads to abnormal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*.

### Objectif

La publication n°I décrit l'identification chez *S. pneumoniae* d'une nouvelle hydrolase du peptidoglycane contenant un domaine PECACE (PEptidoglycan CARbohydrate Cleavage Enzyme) probablement impliqué dans le clivage de la liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  entre les résidus MurNAc et GlcNAc. Les travaux présentés dans cette seconde publication visent à caractériser la fonction de cette protéine de 23 kDa, Pmp23 (Pneumococcal Membrane Protein). Ils reposent essentiellement sur la caractérisation phénotypique d'une souche pneumococcale dont le gène *pmp23* a été inactivé.

### Pmp23 est une enzyme hydrolysant la paroi cellulaire de *Micrococcus lysodeikticus*

Nous avons exprimé la protéine recombinante membranaire totale Pmp23 chez *E. coli* et nous l'avons purifiée par chromatographie d'affinité en présence de détergent. Cette protéine a été utilisée afin de réaliser un test *in vitro* basé sur la technique de zymogramme : l'activité d'hydrolyse de la paroi cellulaire est détectée après renaturation de la protéine dans un gel SDS-PAGE dont la matrice polyacrylamide contient des cellules lyophilisées de *Micrococcus lysodeikticus* ce qui confère un aspect opaque au gel. Une zone plus claire apparaît sur le gel à l'emplacement où la protéine a migré. Nous parvenons ainsi à démontrer que Pmp23 est capable d'hydrolyser la paroi cellulaire de *Micrococcus lysodeikticus*.

### **L'inactivation du gène *pmp23* conduit à une sensibilité accrue à la lyse en présence de pénicilline G**

La pénicilline G inhibe les enzymes de synthèse du peptidoglycane et conduit à la lyse bactérienne. Nous avons étudié l'effet de la pénicilline G sur une souche mutée au niveau du gène *pmp23* afin de tester une éventuelle relation entre l'activité de Pmp23 et le métabolisme du peptidoglycane. Nous montrons que cette souche mutée a une viabilité réduite et lyse plus rapidement sous l'action de la pénicilline G en comparaison à la souche de type sauvage. Cette plus grande sensibilité à la pénicilline G des bactéries mutées indique donc un rôle de Pmp23 dans le métabolisme du peptidoglycane.

### **L'inactivation du gène *pmp23* est responsable de la formation de septa anormaux**

Des coupes de bactéries sauvages et mutées sont observées en microscopie électronique à transmission : par comparaison avec des bactéries de type sauvage, nous remarquons la présence de formes aberrantes dues à une septation anarchique, se traduisant par des septa multiples et mal positionnés dans 15 à 20% des bactéries mutées. L'épaisseur du peptidoglycane ne paraît pas modifiée et reste régulière. Ainsi, il apparaît que Pmp23 intervient dans les étapes précoces de formation du septum durant la division cellulaire.

### **Conclusion**

Suite à l'identification d'une nouvelle hydrolase potentielle du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*, nous nous sommes intéressés au rôle de cette enzyme membranaire.

En accord avec les analyses de séquences précédentes sur le domaine PECACE, nous montrons ici, que l'activité enzymatique de Pmp23 est probablement liée à sa capacité à hydrolyser la paroi cellulaire bactérienne constituée majoritairement de peptidoglycane. Cependant, malgré plusieurs tentatives nous n'avons pas réussi à caractériser les produits de réaction de Pmp23 ni à identifier son site de clivage du peptidoglycane.

Grâce à l'analyse phénotypique du mutant *pmp23*, nous démontrons que Pmp23 est nécessaire à la localisation du septum. Pmp23 pourrait permettre une localisation correcte du site de synthèse de peptidoglycane septal, en clivant les brins de peptidoglycane nouvellement synthétisés à des sites erronés dans la cellule. D'autre part, la délétion simultanée de PBP1a et PBP1b ainsi que de PBP2a et PBP1b et l'inactivation de PBP3 génèrent un phénotype analogue. Aussi, une autre hypothèse pourrait être l'implication de Pmp23 dans un complexe faisant intervenir les enzymes de synthèse septale. Par interaction moléculaire, Pmp23 pourrait initier la synthèse septale en permettant le recrutement et le positionnement des PBPs. La division cellulaire est un processus d'une telle complexité que sa régulation doit être finement contrôlée par l'intervention de nombreuses protéines dont, potentiellement, Pmp23.

# **The inactivation of the new peptidoglycan hydrolase Pmp23 leads to abnormal septum formation in *Streptococcus pneumoniae***

Pagliari E.<sup>1</sup>, Dublet B.<sup>2</sup>, Frehel C.<sup>3</sup>, Dideberg O.<sup>4</sup>, Vernet T.<sup>1§</sup>, Di Guilmi A.M.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules

<sup>2</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines

<sup>4</sup>Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire

<sup>1,2,4</sup>Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CEA-CNRS UMR 5075-UJF), 41 Rue Jules Horowitz  
38027 Grenoble cedex 1, France

<sup>3</sup>INSERM U570, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris cedex  
15, France

§ Corresponding author. Mailing address: Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel,

41 Rue Jules Horowitz 38027 Grenoble cedex 1, France.

Phone: 33-04 38 78 96 81. Fax: 33-04 38 78 54 94. E-mail: [vernet@ibs.fr](mailto:vernet@ibs.fr).

Abbreviations : PBP, Penicillin-Binding Proteins ; PECACE, PEptidoglycan CARbohydrate Cleavage Enzyme; Pmp23, Pneumococcal Membrane Protein of 23 kDa; CFU, colony forming unit

## ABSTRACT

The bacterial peptidoglycan is the major component of the cell wall which integrity is essential to cell survival. In a previous work, we identified, in the positive-Gram pathogen *Streptococcus pneumoniae*, a unique protein containing a new putative peptidoglycan hydrolytic domain named PECACE (PEptidoglycan CARbohydrate Cleavage Enzyme). In this study, we characterise the physiological function of this protein called Pmp23 (Pneumococcal Membrane Protein of 23 kDa). A cell wall hydrolytic activity is observed with the recombinant protein. Inactivation of the *pmp23* gene in the pneumococcus led to a decreased flocculation, an increased sensitivity to  $\beta$ -lactam antibiotics and morphological alterations affecting the formation and localisation of the division septa. Taken together these observations indicate that Pmp23 is a hydrolase whose function is linked to peptidoglycan metabolism at the septum site.

## INTRODUCTION

The external bacteria cell wall gives the cellular morphological shape and allows resisting to the intracellular pressure. These properties are due to the main component of the cell wall, the peptidoglycan. This strong scaffolding structure is formed by glycan strands and peptide chains held together by covalent bonds, resulting in a mono- or multilayered network. The glycan strands are composed of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramyl residues linked together by  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds. Peptides are covalently attached through amide bond to the lactyl group of the muramic acid and their cross-linking result in the net structure of the peptidoglycan.

The final steps of the peptidoglycan synthesis take place in the extracellular space and are catalyzed by the Penicillin-Binding Proteins (PBPs) anchored in the cytoplasmic membrane. The optimal peptidoglycan metabolism requires also the participation of hydrolases which must function in concert with the PBPs. Even though their precise roles are poorly understood, these enzymes participate in fundamental biological functions by allowing the insertion of new material into the existing peptidoglycan and by triggering cell separation following division. The hydrolases contribute to peptidoglycan degradation and recycling and participate in autolysis under certain growth conditions. They remodel the peptidoglycan to facilitate the passage of macromolecular transport systems (Holtje, 1995).

*Streptococcus pneumoniae* is a pathogenic agent which is responsible for over one million yearly deaths worldwide, causing pneumonia, otitis media, and sepsis cases, notably in the very young and in the elderly population. Infection by *S. pneumoniae* has been classically and successfully treated with  $\beta$ -lactam antibiotics which inhibit the PBPs peptidoglycan synthetases. However, the increase in multi drug-resistant strains worldwide is a large medical and social problem as 25% of all invasive *S. pneumoniae* strains are today resistant to penicillins (Pallares *et al.*, 2000). The future will most probably reside in the development of new drugs targeting bacterial essential processes.

The pattern of peptidoglycan hydrolases in *S. pneumoniae* includes a low molecular weight PBP with a D,D-carboxypeptidase activity involved in the regulation of the bacterial division and five cleaving

enzymes. Four of these, LytA, LytB, LytC and CbpD are cell wall-associated proteins harbouring Choline-Binding Domains interacting with choline residues present on cell wall teichoic and lipoteichoic acids (Holtje and Tomasz, 1975; Mosser and Tomasz, 1970). LytA is an autolytic amidase causing bacteriolysis in stationary phase and in the presence of antibiotics (Tomasz and Waks, 1975). LytB is a glucosaminidase involved in cell separation as a *lytB* mutant forms very long pneumococcal chains of over 100 cells (De Las Rivas *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 1999). LytC is a lysozyme with an autolytic behaviour at 30°C (Garcia *et al.*, 1999). Finally, CbpD and PcsB contain a CHAP domain (Cysteine, Histidine-dependent amidohydrolase/peptidase) predicted to cleave a peptidic bond but definitive biochemical data are still lacking (Bateman and Rawlings, 2003; Rigden *et al.*, 2003). These hydrolases play various roles such as autolysis in the competence process for LytA, LytC and CbpD (Guiral *et al.*, 2005; Kausmally *et al.*, 2005) and colonization of the nasopharynx, the initial step of the pneumococcal pathogenesis for LytB, LytC and CbpD (Gosink *et al.*, 2000). While LytB is involved in cell separation during the late step of division, PcsB, the only essential pneumococcal hydrolase to date, appears to be involved in the early stages of the division since under-expression of PcsB leads to the formation of misplaced septa and large cells (Ng *et al.*, 2004).

In a previous work, we have identified in the pneumococcus genome a new domain harbouring motifs that infer potential peptidoglycan cleavage activity. For this reason we named this domain PECACE (PEptidoglycan CARbohydrate Cleavage Enzyme). This domain was found exclusively in Gram-positive bacterial species; furthermore, its genetic organization is conserved among streptococcal species, suggesting a significant cellular role for the PECACE function. In addition, the PECACE domain is in various instances found in association with other domains known to catalyze peptidoglycan hydrolysis: this observation reinforces the predicted function of PECACE as participating in peptidoglycan cleavage and represents another example of multifunctional proteins involved in peptidoglycan metabolism. The PECACE domain identified in the pneumococcus genome is present in a sequence containing 204 amino acids (predicted molecular weight of 23 kDa), which harbour a short cytoplasmic region, a transmembrane anchor and a large extracellular region; this protein has been named Pmp23 for Pneumococcal Membrane Protein.

We describe here the functional characterization of the Pmp23 protein in the *S. pneumoniae* R6 strain.

## METHODS

**Cloning of the *pmp23* gene from the *S. pneumoniae* R6 strain.** Genomic DNA from R6 strain was used as a template to amplify the complete *pmp23* gene containing the cytoplasmic region, the transmembrane anchor and the periplasmic domain. The upstream 5'-CGCGGATCCTTTAAACGAATTCGAAGAGTGCTTGTACTAGCAGTC-3' and downstream 5'-CCGCTTCGAGCTAGCCAGATGTTGAAAAGAGAGTGAACATTTGATGAT-3' primers have respectively BamHI and XhoI sites (underlined). pGEX-4T-1/*pmp23* plasmid was obtained by cloning the PCR product into pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences) and the absence of mutations into the *pmp23* gene was checked by sequencing (Genome Express, Grenoble).

**Inactivation of the *pmp23* gene in the *S. pneumoniae* R6 strain.** Upstream and downstream flanking regions of *pmp23* (–504 to +307 and +399 to +1026 positions, respectively) were amplified by PCR and cloned into the pFW13 plasmid; the cloning sites are on both sides of the *aacA/aphD* cassette encoding for kanamycin/gentamycin-resistance (Podbielski *et al.*, 1996). *S. pneumoniae* R6 strain was transformed with 50 ng of pFW13/*pmp23*. Colonies resulting from homologous recombination were selected on blood agar plates in the presence of 300  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of kanamycin. Inactivation of the *pmp23* gene was verified by PCR using external primers and PCR products obtained have been sequenced. The *pmp23::kan* R6 mutant strain was grown in Bacto™ Todd Hewitt broth (TH broth) (BD Sciences) until an optical density at 620 nm ( $\text{OD}_{620}$ ) of 0.2 was reached. Cells were spun at 3,000 x g for 15 min and resuspended in TH broth containing 25% glycerol in order to concentrate the cellular suspension twice and 2 ml-aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Deletion of *lytA* and *lytC* genes in R6 and *pmp23::kan* R6 strains.** The phenotype of the pneumococcal R1547 strain is *lytA::cam*, *lytC::tet*, *pmp23::kan* (Guiral *et al.*, 2005). The resistance cassettes (*lytA::cam* and *lytC::tet*) have been used for transformation of the R6 strain in order to generate single and double deletion mutants: *lytA*, *lytC*, *lytA/pmp23* and *lytC/pmp23*. Antibiotic concentrations used for the selection of transformants were: chloramphenicol, 4.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; tetracycline, 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and kanamycin, 300  $\mu\text{g/mL}$ . For each strain, the presence or the absence of *lytA*, *lytC* and *pmp23* genes was checked by PCR. Mutants were stored as previously described for the *pmp23::kan* R6 mutant strain.

**Growth rate measurements and cell viability assay.** 2 mL cultures of *S. pneumoniae* with an  $\text{OD}_{620}$  of 0.4 were used to inoculate 50 mL of TH broth or glucose-buffered broth (Diagnostics Pasteur) at  $37^{\circ}\text{C}$ . Whenever cell flocculation was observed, the  $\text{OD}_{600}$  reading was performed on the upper region of the unmixed culture tube. When required, 0.06  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of penicillin G was added when the cultures reached an  $\text{OD}_{620}$  of 0.3-0.4. Assays of cell viability were performed by serial dilutions: 100  $\mu\text{l}$  of cell suspension were deposited on Petri dish overlaid with 20 ml of Columbia blood agar base EH (BD Sciences) containing 4% horse blood (Eurobio) before incubation for 18h at  $37^{\circ}\text{C}$ .

**MIC testing.** The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for different  $\beta$ -lactams were measured three times using the E-test method (AB Biodisk). When different discrete values were measured, the results were expressed as a range of the maximal and minimal values.

**Morphological characterization.** Optical fluorescence microscopy was used to observed morphological changes in the various R6 mutant strains. Cells in exponential phase were fixed in 2.5% (v/v) paraformaldehyde, 0.03% glutaraldehyde, 30 mM sodium phosphate (pH 7.5) for successively 15 min at room temperature and 45 min on ice. Cells were washed three times in PBS pH 7.4 and resuspended in 50 mM glucose, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA. 30  $\mu\text{l}$  of cell suspension were deposited on poly-lysine slides (Sigma), unbound cells were washed with PBS and a final fixation-permeabilization step was



performed using ice-cold methanol for 5 min. A solution of fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma) at 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  was deposited on the fixed cells and was incubated for 45 min at room temperature. Labelled cells were washed 5 times with PBS and mounted in Moviol. The observations were performed with a 100 X immersion objective on an Axioplan 2 fluorescence microscope (Zeiss) equipped with axiocam MR imaging system and axiovision software (Zeiss).

Transmission electron microscopy was performed on ultra-thin sections of wild-type and *pmp23::kan* mutant R6 strains using with a JEOL 100-CXII electron microscope. Cell samples cultured in glucose-buffered broth at 30°C were taken from early and late exponential phases and processed as previously described (Frehel *et al.*, 1988). Briefly, after centrifugation at 7,000 x g during 3 min, the bacteria pellet was fixed overnight at 4°C in a solution of 2.5% glutaraldehyde in TEM buffer (100mM sodium cacodylate pH 7.2, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Fixed-cells were washed twice in TEM buffer, post-fixed for 1h in 1% osmium tetroxide in TEM buffer followed by an 1h-incubation with 1% uranyl acetate dissolved in 100 mM veronal pH 6.8. The dehydration was performed using acetone and the cell pellets were embedded in Epon. Thin sections were double-stained with uranyl acetate and lead citrate.

**Expression and purification of recombinant GST-Pmp23 protein in *Escherichia coli*.** An overnight culture of an *E. coli* MC1061 expression strain transformed with pGEX-4T-1/*pmp23* plasmid was used to inoculate (1:50) 1l of rich medium for autoinduction (1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5% (w/v) glycerol, 0.05% (w/v) glucose, 0.2% (w/v)  $\beta$ -lactose, 0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) tryptone, pH 6.8) supplemented with 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of ampicillin, the growth is performed at 30°C. The cells were centrifuged at 6,000 x g for 20 min when the culture reached an  $\text{OD}_{600}$  value around 10. All purification steps were performed at 4°C. Cell lysis was made by sonication in 50 mM Na acetate pH 5.3, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, with a protease inhibitor cocktail tablet (Complete, Roche). The supernatant fraction obtained after low-speed centrifugation (2,000 x g, 15 min) was ultra-centrifuged at 184,000 x g for 1h. The membrane-enriched fraction recovered in the pellet was resuspended in 50 mM Na acetate pH 5.3, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% Triton X-100 and stirred overnight before a second identical ultra-centrifugation step. The resulting supernatant, containing the detergent-solubilized GST-Pmp23 protein, was loaded at a flow rate of 1 ml/min onto a glutathione Sepharose column (Amersham Biosciences) equilibrated in 50 mM Na acetate pH 5.3, 200 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5% Triton X-100. GST-Pmp23 was eluted with 10 mM reduced glutathione (Sigma) and dialysed against column equilibration buffer.

**Detection of murein-degrading activity by the zymogram technique.** Purified GST-Pmp23 protein was loaded on a 12.5% SDS polyacrylamide gel containing 0.023% (w/v) of *Micrococcus lysodeikticus* lyophilized cells (Sigma): the run was performed under denaturing conditions (Bernadsky *et al.*, 1994; Leclerc and Asselin, 1989; Potvin *et al.*, 1988; Sugai *et al.*, 1990). The gel was washed twice in distilled water for 30 min at room temperature, the in-gel renaturation of GST-Pmp23 protein was subsequently performed by incubating the gel for 48 h in 50 mM Na acetate pH 5.3, 10 mM  $\text{MgSO}_4$  1% Triton X-100 at 30°C. The gel was stained with 0.1% methylene blue in 0.01% KOH and destained in water.

## RESULTS

### Predicted topology of Pmp23

We have previously reported the identification of the PECACE domain putatively involved in peptidoglycan hydrolysis (Pagliero *et al.*, 2005). The probable enzymatic activity deduced from the detailed analysis of the amino-acid sequence suggested that the PECACE domain might proceed through a lytic transglycosylase-type with Slt70 as the paradigm enzyme or goose lysozyme-type cleavage mechanism. PECACE domain was exclusively found in Gram-positive bacteria, alone or in association with others domains known to hydrolyse the peptidoglycan.

In *S. pneumoniae*, this domain is contained in a 204 amino-acid protein (calculated mass of 23 kDa), called Pmp23. The predicted topology is presented in Fig. 1: a short cytoplasmic peptide (M<sub>1</sub> to R<sub>7</sub>) precedes the transmembrane anchor (V<sub>8</sub> to G<sub>18</sub>) and the extracellular region (Y<sub>19</sub> to G<sub>204</sub>) contains the PECACE domain (P<sub>36</sub> to A<sub>140</sub>). Considering the membrane topology of Pmp23 and the putative enzymatic activity deduced from the amino-acid sequence, it appears that the Pmp23 function may differ from the other hydrolases already identified in *S. pneumoniae*, LytA, LytB, LytC, CbpD and PcsB. In order to shed light on the physiological function of Pmp23, the corresponding gene has been deleted by double homologous recombination in the R6 strain and the phenotype of the mutant strain has been analyzed in details.

### Growth properties of R6 and *pmp23::kan* mutant strains

We compared the growth of the R6 and *pmp23::kan* mutant strains in TH and in glucose-buffered broths: the growth rate,  $41 \pm 2.5$  min, and the autolysis profile were identical for both strains in either media culture (data not shown).

We then analysed the flocculation behaviour in glucose-buffered broth of R6 *S. pneumoniae* strain, which corresponds to the spontaneous cell aggregation and formation of a bacterial pellet leading to a decrease of the OD<sub>600</sub> in the upper section of the culture tube. In these culture conditions, the R6 parental strain shows a rapid decrease of the OD<sub>600</sub> value 100 min after reaching the stationary phase (fig. 2). On the contrary, the OD<sub>600</sub> value of the *pmp23::kan* mutant strain remains at 1.1 for 3h after the beginning of the stationary phase and then, the OD<sub>600</sub> decreases to a value of about 0.5 after 27h (Fig. 2). It may be supposed that the specific flocculation behaviour of the *pmp23::kan* mutant strain is likely to be due to a modification of the cell wall main component, the peptidoglycan, as it is in direct contact with the culture medium in the absence of a capsule.

### Inactivation of the *pmp23* gene increases the $\beta$ -lactam sensitivity

The antibiotic sensitivity of the R6 and the *pmp23::kan* mutant strains were analyzed by measuring the MIC values for various  $\beta$ -lactams using the E-Test method. The MIC values for cefotaxime or penicillin G are  $0.025\text{--}0.038 \mu\text{g ml}^{-1}$  and  $0.016 \mu\text{g ml}^{-1}$  for the wild-type and the *pmp23::kan* mutant strains, respectively. The MIC values for piperacillin are  $0.032\mu\text{g ml}^{-1}$  and  $0.016\text{--}0.023 \mu\text{g ml}^{-1}$  for the R6 and the *pmp23::kan* mutant strains, respectively.

According to these results, the sensitivity towards penicillin G was then analyzed in liquid cultures: cell lysis ( $OD_{620}$  values) and the viability (CFUs numbering on plates) were measured in the presence of penicillin G (Fig. 3). Both parental and mutant strains were grown in TH broth at 37°C, penicillin G was added at a concentration of  $0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$  when mid-exponential growth phase was reached and the culture growth was pursued for 2h post-penicillin G addition. In absence of penicillin G, the growth curves are identical for both strains, the stationary phases are reached concomitantly (Fig. 3A, open symbols) and the cell viability for both strains is also comparable (Fig. 3B, open symbols). The addition of penicillin G in the pneumococcal cultures induces a more rapid and pronounced lysis of the mutant strain than of the R6 parental strain (Fig. 3A, closed symbols). Indeed, 130 min post-penicillin G addition, 97 % of the *pmp23::kan* mutant cells were lysed compared to the lysis of only 46 % of the parental cells. The pattern of cell lysis is correlated to the cell viability: in presence of penicillin G, the mutant strain is killed more rapidly and to a larger extend (one log difference) when compared with the parental strain (Fig. 3B, closed symbols). In conclusion, the absence of a functional *pmp23* gene in *S. pneumoniae* increases  $\beta$ -lactam sensitivity.

#### **Altered division sites in the *pmp23::kan* mutant strain**

Ultra thin sections of both R6 and *pmp23::kan* mutant cells were observed by transmission electron microscopy. As shown in Fig. 4, the *pmp23::kan* mutant strain displays morphological aberration when compared to the parental strain. The wild-type strain presents a typical streptococcal morphology with a regular shape and a symmetrical septum formation giving rise to two identical daughter cells (Fig. 4A). The mutated strain shows abnormal shape due to a non-symmetrical septum formation or to the presence of several septa (Fig. 4B). Observation by transmission electron microscopy of mutant cells negatively stained indicated that abnormal cells represent 15% to 20% of the total mutated population. This result indicates that Pmp23 may play a role in the positioning of the division site and/or maturation of the septum.

#### **Expression and purification of a recombinant form of Pmp23 protein**

Pmp23 protein was expressed in *E. coli* in order to test its putative peptidoglycan hydrolysis activity. The protein was particularly difficult to express in a soluble form. Attempts at expressing the whole Pmp23 protein (residues 1 to 204) or the extracellular region (residues 36 to 204) fused to polyhistidine tags or to the signal peptide *pelB* (allowing the secretion into the periplasmic space of *E. coli*) delivered inclusion bodies. Low amounts of soluble protein was obtained when the extracellular region of Pmp23 was expressed fused C-terminal to the GST. The fusion protein co-purified with the GroEL chaperone, indicating that it was not properly folded. The expression of the full-sized protein linked to GST led to a fused protein that co-purified with the *E. coli* membrane fraction showing that Pmp23 is, as predicted, a membrane protein (data not shown). In order to increase the recovery yield, the GST-Pmp23 protein was extracted with 2% Triton X-100 from whole cell lysate. Affinity purification on a glutathione column was performed in the presence of 0.5% Triton X-100 (Foster, 1992; Jennings *et al.*, 2002; Sugai *et al.*, 1990; Ursinus and Holtje, 1994). The apparent molecular weight of the purified GST-Pmp23 protein was 49.3 kDa in accordance with the calculated mass of 49.2 kDa (Fig. 5A). As expected, this protein reacts against anti-GST and anti-Pmp23

antibodies (data not shown). The fusion protein is highly unstable and some 26.3 kDa GST moiety is always found free from the fusion (Fig. 5A). All together, about 1 mg of GST-Pmp23 protein was purified from 1 liter of *E. coli* culture, a good yield considering the membranous property of Pmp23.

### Activity of recombinant Pmp23 protein

The cell wall lysis activity of Pmp23 was tested using the in-gel zymogram technique. Purified GST-Pmp23 was run on a SDS-polyacrylamide gel containing *Micrococcus lysodeikticus* lyophilized cells. Following protein renaturation, a clear band within the opaque background appeared at the location of the GST-Pmp23 protein (Fig. 5B1). The contrast between the band and the background was enhanced by staining the gel with methylene blue (Fig. 5B2). This experiment shows that the full-size Pmp23 protein fused to GST is functional as it has the ability to degrade a bacterial extract containing peptidoglycan.

### Phenotype analysis of the *pmp23* inactivation in *lytA* and *lytC* R6 mutant strains

In order to investigate the relationship between Pmp23 and the well-known pneumococcal autolysins LytA and LytC, the *pmp23* gene has been inactivated in R6 strains in which the genes encoding either autolysins have been inactivated. The growth rates have been measured for the single and double mutant strains compared to the parental R6 strain. Interestingly, the double *lytA/pmp23* and *lytC/pmp23* mutant strains display a growth rate of  $40.5 \pm 3.5$  min similar to the parental strain while the single *lytA* and *lytC* mutant strains present a longer generation time of  $47 \pm 1.4$  min (data not shown).

The sensitivity to lysis induced by penicillin G has also been studied for all mutant strains (Fig. 6). As already reported, the *lytA* mutant strain displays a much reduced sensitivity to penicillin-induced lysis when compared to R6 strain (Berry *et al.*, 1989; Moreillon *et al.*, 1990; Ronda *et al.*, 1987; Sanchez-Puelles *et al.*, 1986; Tomasz and Waks, 1975; Tomasz *et al.*, 1988) (Fig. 6A). As already described in this work, the *pmp23::kan* mutant is more sensitive to penicillin G than the parental R6 strain. The double *lytA/pmp23* mutant displays an intermediate sensitivity between those of *lytA* and *pmp23* mutant strains (Fig. 6A). The *lytC* single mutant is slightly less sensitive to penicillin G-induced lysis than the parental strain while the double *lytC/pmp23* strain harbours a lysis pattern more comparable to the *pmp23::kan* mutant strain (Fig. 6B). These experiments have also been performed at 30°C and similar results have been observed (data not shown). These experiments suggest that the role of Pmp23 is independent from the functions of LytA and LytC, which are involved in cells separation at the end of the division process.

Cell separation was monitored by optical fluorescent microscopy following labelling of the cells. R6 and *pmp23::kan* mutant strains present 98% of single- and doubled-cell chains while this value is 75% for *lytC* and *lytC/pmp23* strains and 63% for *lytA* and *lytA/pmp23* mutant strains. The single and double *lytA* and *lytC* mutant strains display also 10 to 20% of chains containing from 4 to 20 cells. The triple mutant strain *lytA/lytC/pmp23* has been analysed: only 34% of the chains are singled or doubled cells, while a significant proportion of chains contains more than 50 cells. These data suggest that Pmp23 is not involved in the separation of the daughter cells after the achievement of the cellular division, as already mentioned above and tend to confirm that the physiological role of Pmp23 is distinct from the function of LytA and LytC.

## DISCUSSION

In a previous work, we have identified the membrane protein Pmp23 of *S. pneumoniae* that carries the PECACE domain (Pagliero *et al.*, 2005). The three-dimensional fold prediction of this domain is analogous to the catalytic sites of the lytic transglycosylase Slt70 from *E. coli* and of the goose-type lysozyme. This domain, found exclusively in Gram-positive bacteria and located within conserved gene clusters in Streptococcal species, is sometimes found in association with other domains known to hydrolyse peptidoglycan like the CHAP, the Nlpc/P60 and the peptidase M37 domains. The 204 amino-acid protein Pmp23 differs from the other pneumococcal hydrolases by its membrane topology: LytA, LytB, LytC and CbpD, all bind to the cell wall choline residues. As a transmembrane protein, Pmp23 is located near the site of peptidoglycan synthesis. The cell wall hydrolytic activity of Pmp23 is supported by our observation that purified GST-Pmp23 fused protein degrades *micrococcus lysodeikticus* extracts as observed on a zymogram.

The *pmp23* gene is not essential. The growth rate of *S. pneumoniae* deleted of the *pmp23* gene is similar to the parent strain and the lysis phase was unaltered showing that Pmp23 is not an autolysin. Indeed, analysis of single or combined *pmp23*, *lytA* and *lytC* mutants revealed that Pmp23 acts on a process that differs from those driven by autolysins LytA and LytC. We observe the following phenotypes associates with the *pmp23::kan* mutant strain: (1), a decreased flocculation; (2), an increased sensitivity to  $\beta$ -lactam antibiotics; (3), morphological alterations affecting the formation and localisation of the division septa. Taken together these observations indicate that Pmp23 is involved in defining the cell surface properties and peptidoglycan metabolism. Pmp23 is unlikely to be involved in major chemical modifications of the peptidoglycan. Indeed, the composition of the peptidoglycan of the R6 and *pmp23::kan* mutant strains is similar when analysed using a combination of RP-HPLC and mass spectrometry (data not shown).

The absence of *pmp23* gene has a striking effect on position and aspect of the septum in a fraction of fast growing cells. This observation might be related to a specific degradation of the peptidoglycan by Pmp23 at inappropriate septum sites. An alternative to this “quality control” hypothesis would call for a role of Pmp23 in defining the localisation of the septum and/or regulating the formation of the septum through peptidoglycan remodelling. This implies that Pmp23 interacts with some cell division proteins and/or septal PBPs. Similar interactions have been reported, in *E. coli* from which lytic transglycosylases and PBPs have been co-purified (Vollmer *et al.*, 1999, Romeis and Holtje, 1994). Aberrant septum localisations in *S. pneumoniae* cells have been described previously for PBP1b/PBP2a and PBP1a/PBP1b double mutants (Paik *et al.*, 1999). The D,D-carboxypeptidase PBP3 has also been shown to regulate the division site since the  $\Delta$ *dacA* mutant displays multiple septa leading to cell widening and spherical morphology (Morlot *et al.*, 2004; Schuster *et al.*, 1990). When the essential peptidoglycan hydrolase PcsB is severely under-expressed, pneumococcus present abnormal cell wall synthesis at misplaced septa (Ng *et al.*, 2004), a phenotype reminiscent to the one found in our *pmp23::kan* mutant. PcsB contains a CHAP domain for hydrolysis of the peptide moiety of peptidoglycan whereas Pmp23 is probably involved in the cleavage of the glycan part. In fact, PECACE domains are sometimes found in association with CHAP domains (Pagliero *et al.*, 2005). It is tempting to propose that Pmp23 and PcsB act in coordinated way to regulate cell wall synthesis. Further

experiments are needed to establish the relationship between Pmp23 and other peptidoglycan hydrolases linked to cell wall synthesis and cell division.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Michel Arthur (LRMA, Université ParisVI, France) for the analysis of the peptidoglycan composition. Jean-Pierre Claverys (Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, Toulouse, France) is acknowledged for the generous gift of R1547 pneumococcal strain. E. P. is a recipient of a CEA CFR fellowship. This work was supported by the European Commission 6<sup>th</sup> framework program grants LSMH-CT-COBRA 2003-503335 and EUR-INTAFAR LSHM-CT-2004-512138.

## REFERENCES

- Bateman, A. & Rawlings, N.D. (2003).** The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 234-237.
- Bernadsky, G., Beveridge, T.J. & Clarke, A.J. (1994).** Analysis of the sodium dodecyl sulfate-stable peptidoglycan autolysins of select gram-negative pathogens by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **176**, 5225-5232.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D. & Paton, J.C. (1989).** Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**, 2324-2330.
- De Las Rivas, B., Garcia, J.L., Lopez, R. & Garcia, P. (2002).** Purification and Polar Localization of Pneumococcal LytB, a Putative Endo-beta-N-Acetylglucosaminidase: the Chain-Dispersing Murein Hydrolase. *J. Bacteriol.* **184**, 4988-5000.
- Foster, S.J. (1992).** Analysis of the autolysins of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **174**, 464-470.
- Frehel, C., Hellio, R., Cremieux, A.C., Contrepois, A. & Bouvet, A. (1988).** Nutritionally variant streptococci develop ultrastructural abnormalities during experimental endocarditis. *Microb. Pathog.* **4**, 247-255.
- Garcia, P., Gonzalez, M.P., Garcia, E., Lopez, R. & Garcia, J.L. (1999).** LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* **31**, 1275-1277.
- Garcia, P., Paz Gonzalez, M., Garcia, E., Garcia, J.L. & Lopez, R. (1999).** The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol. Microbiol.* **33**, 128-138.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I. & Masure, H.R. (2000).** Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**, 5690-5695.
- Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B. & Claverys, J.P. (2005).** Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**, 8710-8715.
- Höltje, J.V., & Tomasz, A. (1975).** Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of Pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **250**, 6072-6076.

**Höltje, J.V. (1995).** From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **164**, 243-254.

**Jennings, G.T., Savino, S., Marchetti, E., Arico, B., Kast, T., Baldi, L., Ursinus, A., Holtje, J.V., Nicholas, R.A., Rappuoli, R. & Grandi, G. (2002).** GNA33 from *Neisseria meningitidis* serogroup B encodes a membrane-bound lytic transglycosylase (MltA). *Eur. J. Biochem.* **269**, 3722-3731.

**Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E. & Havarstein, L.S. (2005).** Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J. Bacteriol.* **187**, 4338-4345.

**Leclerc, D. & Asselin, A. (1989).** Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* **35**, 749-753.

**Moreillon, P., Markiewicz, Z., Nachman, S. & Tomasz, A. (1990).** Two bactericidal targets for penicillin in pneumococci: autolysis-dependent and autolysis-independent killing mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 33-39.

**Morlot, C., Noirclerc-Savoye, M., Zapun, A., Dideberg, O. & Vernet, T. (2004).** The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **51**, 1641-1648.

**Mosser, J.L. & Tomasz, A. (1970).** Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J. Biol. Chem.* **245**, 287-298.

**Ng, W.L., Kazmierczak, K.M. & Winkler, M.E. (2004).** Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Mol. Microbiol.* **53**, 1161-1175.

**Pagliero, E., Dideberg, O., Vernet, T. & Di Guilmi, A.M. (2005).** The PECACE domain: a new family of enzymes with potential peptidoglycan cleavage activity in Gram-positive bacteria. *BMC Genomics* **6**, 19.

**Paik, J., Kern, I., Lurz, R. & Hakenbeck, R. (1999).** Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.* **181**, 3852-3856.

**Pallares, R., Viladrich, P.F., Linares, J., Cabellos, C. & Gudiol, F. (2000).** Impact of antibiotic resistance on chemotherapy for pneumococcal infections. In *Streptococcus pneumoniae*. Tomasz, A. (ed). New York: Mary Ann Liebert Inc. Publishers.

**Podbielski, A., Spellerberg, B., Woischnik, M., Pohl, B. & Luttmann, R. (1996).** Novel series of plasmid vectors for gene inactivation and expression analysis in group A streptococci (GAS). *Gene* **177**, 137-147.

**Potvin, C., Leclerc, D., Tremblay, G., Asselin, A. & Bellemare, G. (1988).** Cloning, sequencing and expression of a *Bacillus* bacteriolytic enzyme in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **214**, 241-248.

**Rigden, D.J., Jedrzejewski, M.J. & Galperin, M.Y. (2003).** Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of gamma-D,L-glutamate-specific amidohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 230-234.

**Romeis, T. & Holtje, J.V. (1994).** Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 21603-21607.

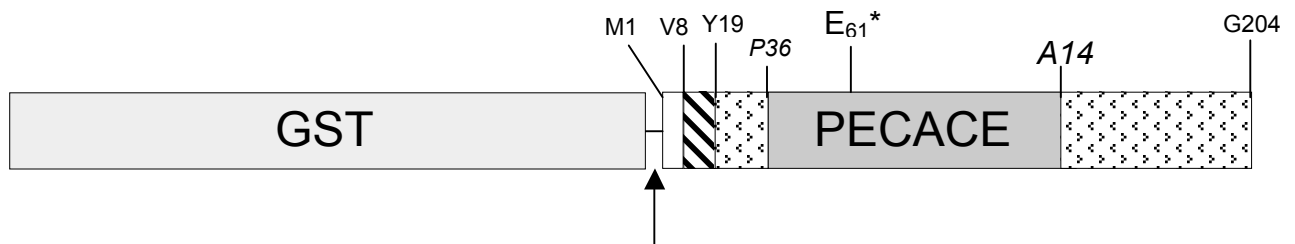
**Ronda, C., Garcia, J.L., Garcia, E., Sanchez-Puelles, J.M. & Lopez, R. (1987).** Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.* **164**, 621-624.

- Sanchez-Puelles, J.M., Ronda, C., Garcia, J.L., Garcia, P., Lopez, R. & Garcia, E. (1986).** Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur. J. Biochem.* **158**, 289-293.
- Schuster, C., Dobrinski, B. & Hakenbeck, R. (1990).** Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *J. Bacteriol.* **172**, 6499-6505.
- Sugai, M., Akiyama, T., Komatsuzawa, H., Miyake, Y. & Suginaka, H. (1990).** Characterization of sodium dodecyl sulfate-stable *Staphylococcus aureus* bacteriolytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **172**, 6494-6498.
- Tomasz, A. & Waks, S. (1975).** Enzyme replacement in a bacterium: phenotypic correction by the experimental introduction of the wild type enzyme into a live enzyme defective mutant pneumococcus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 1311-1309.
- Tomasz, A., Moreillon, P. & Pozzi, G. (1988).** Insertional inactivation of the major autolysin gene of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **170**, 5931-5934.
- Ursinus, A. & Holtje, J.V. (1994).** Purification and properties of a membrane-bound lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 338-343.
- Vollmer, W., von Rechenberg, M. & Holtje, J.V. (1999).** Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**, 6726-6734.



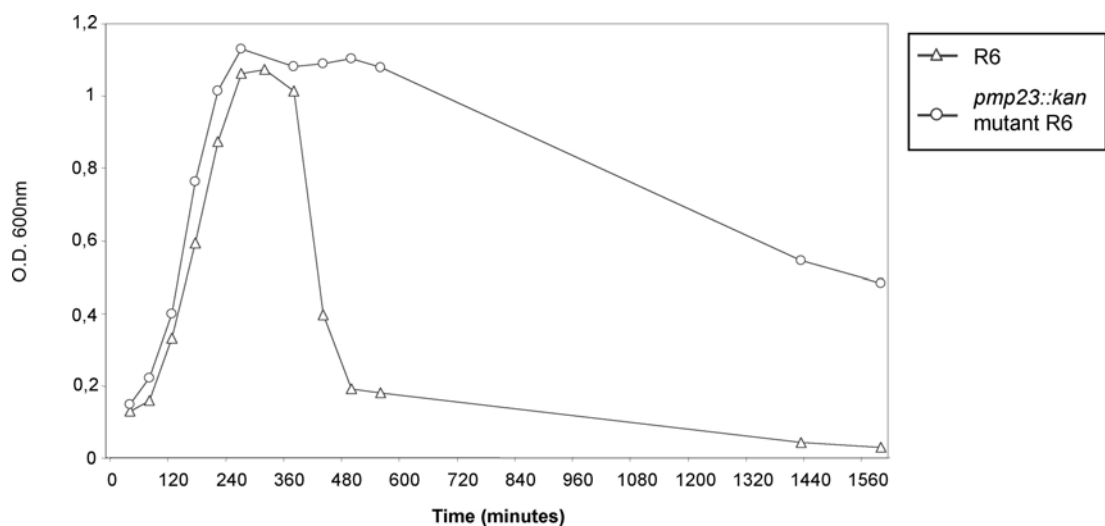
**Fig. 1. Schematic representation of the topology of Pmp23**

White and hatched boxes correspond to the cytoplasmic region and the transmembrane anchor, respectively. The extracellular region is figured by the black dotted box and the PECACE domain in grey. The asterisk indicates the potential catalytic glutamate E61. The fusion protein glutathione-*S*-transferase (GST) and the thrombin site are indicated by a light grey box and an arrow, respectively.



**Fig. 2. Flocculation measurements of the R6 parental and *pmp23::kan* mutant strains**

*S. pneumoniae* R6 strain (open triangle) and *pmp23::kan* mutant (open circle) were grown in glucose-buffered broth. One representative of at least three experiments is shown.

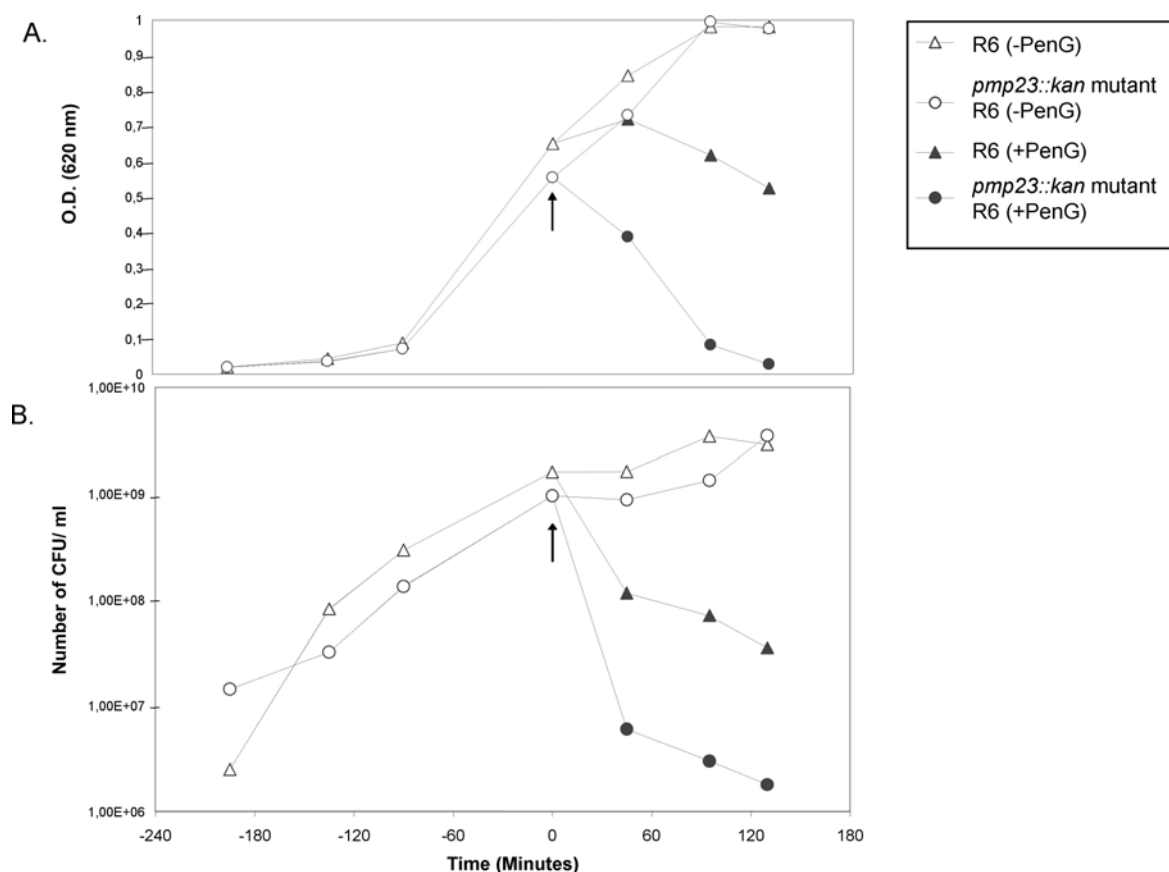


**Fig. 3. Effect of *pmp23::kan* mutation on penicillin-induced lysis and death**

*S. pneumoniae* R6 strain (open triangle) and *pmp23::kan* mutant (open circle) were exposed (closed symbols) or not (open symbols) to 0.06  $\mu\text{g/mL}$  of penicillin G in TH broth. The arrow indicates penicillin G addition. In each case, one representative of four experiments at least is shown.

(A) Lysis of *S. pneumoniae* R6 strain and *pmp23::kan* mutant in presence or absence of penicillin G.

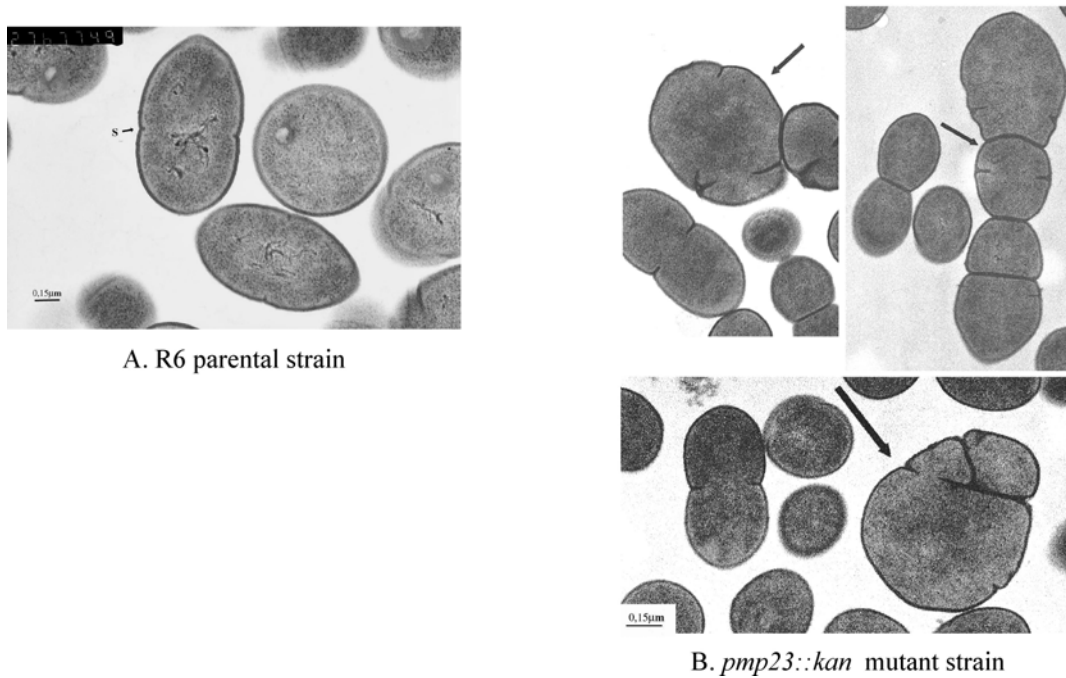
(B) Viability of *S. pneumoniae* R6 strain and *pmp23::kan* mutant in presence or absence of penicillin G.



**Fig. 4. Electron microscopy of thin sections of R6 parental and *pmp23::kan* mutant strains**

(A) R6 strain. All bacteria display the typical streptococcal morphology with regular shape due to symmetrical septum (S) formation.

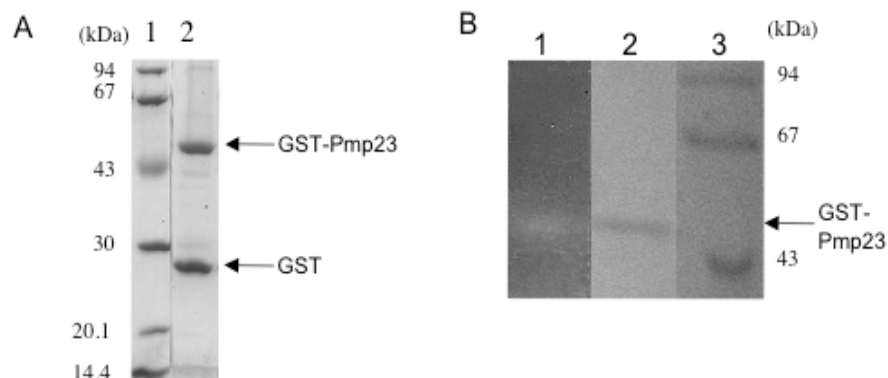
(B) *pmp23::kan* mutant. Abnormal cells and septa are indicated by arrows.



**Fig. 5. GST-Pmp23 purification and zymogram**

(A) SDS-12.5% PAGE gel stained with Coomassie blue. Lane 1, standard molecular mass markers; lane 2, purified GST-Pmp23.

(B) Zymogram analysis: SDS-12.5% PAGE gel containing *Micrococcus lysodeikticus* cells. Lane 1, renaturation of purified GST-Pmp23; lane 2, purified GST-Pmp23 stained with Coomassie blue; lane 3, standard molecular mass markers.

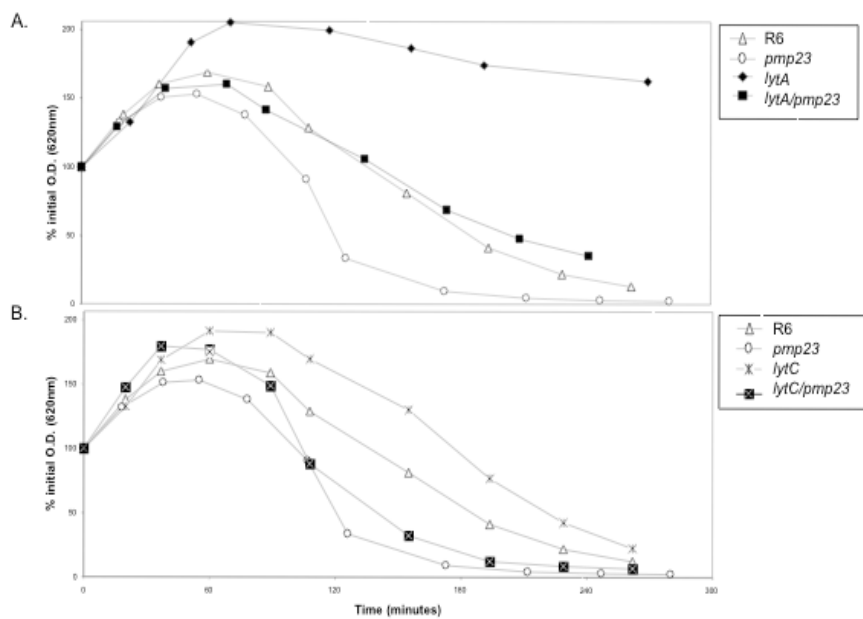


**Fig. 6. *pmp23::kan* mutation in *lytA* and *lytC* mutant R6 strains**

The strains were exposed to 0.06  $\mu\text{g/mL}$  of enicillin G in TH broth. The lysis of each strain was followed by monitoring the optical density at 620 nm. To compare the effect of Penicillin G on the different strains, the relative Penicillin G sensibility is presented as the percent of the initial  $\text{OD}_{620}$  measured just before penicillin addition. This experiment is representative of four assays.

(A) *lytA* background

(B) *lytC* background



## Expériences complémentaires

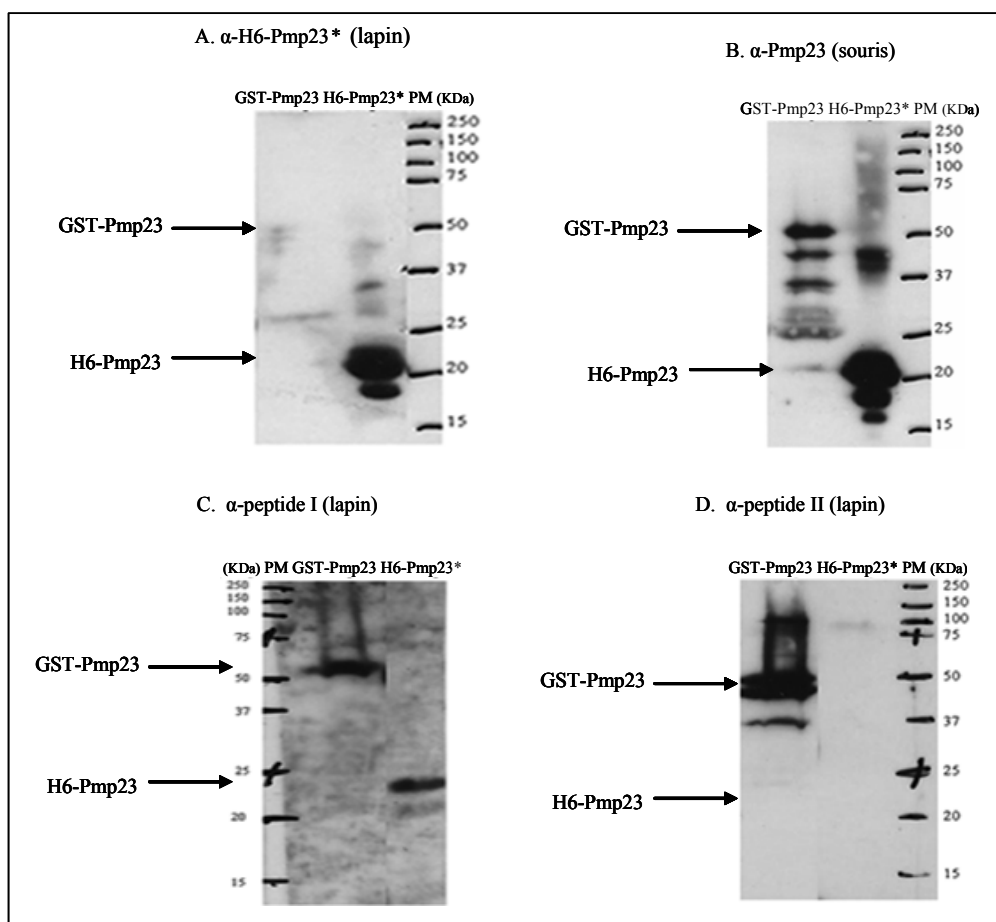
### I. Production d'anticorps et immunolocalisation

Des anticorps dirigés contre Pmp23 ont été produits dans le but d'étudier la localisation de Pmp23 au cours du cycle cellulaire. Au laboratoire C. Morlot a mis au point une méthode permettant d'effectuer simultanément deux marquages de protéine par fluorescence en parallèle avec un marquage de l'ADN chromosomique chez *S. pneumoniae*. En fonction des motifs de marquage des chromosomes et de la protéine FtsZ impliquée dans la constriction de la membrane plasmique au cours de la division cellulaire, dont le comportement est parfaitement connu, la localisation d'une protéine d'intérêt peut être reconstituée au cours du cycle cellulaire.

Quatre types d'anticorps différents ont été produits : le premier  $\alpha$ -H6-Pmp23\* a été produit chez le lapin à partir de la protéine dénaturée H6-Pmp23\* (partie soluble extracellulaire de Pmp23) et le second  $\alpha$ -Pmp23 a été obtenu chez la souris à partir de la protéine GST-Pmp23. Enfin, deux peptides synthétiques de Pmp23 (F<sub>127</sub>IAQNGKENTLALAKQ<sub>142</sub> et T<sub>159</sub>YSYIHPISIFHGAELYVNG<sub>178</sub>) ont servi à la production dans le lapin respectivement du sérum  $\alpha$ -peptide I et du sérum  $\alpha$ -peptide II.

Ces différents anticorps ont été testés par western blot sur la protéine recombinante GST-Pmp23 et la protéine dénaturée H6-Pmp23\* ainsi que sur des extraits cellulaires des souches de *S. pneumoniae* R6 sauvage et délétée du gène *pmp23*. Des études d'immunofluorescence avec marquage de la protéine Pmp23 ont été réalisées sur les deux souches.

Ainsi, en western blot, alors que l'anticorps  $\alpha$ -H6-Pmp23\* reconnaît la protéine dénaturée H6-Pmp23\*, la protéine recombinante GST-Pmp23 n'est pas détectée (Fig.1.A.). Les anticorps  $\alpha$ -Pmp23 et  $\alpha$ -peptide I révèlent les deux protéines recombinantes (Fig.1.B et 1.C.) et l'anticorps  $\alpha$ -peptide II ne reconnaît que la protéine GST-Pmp23 (Fig.1.D).



**Figure 1. Western blots des protéines recombinantes GST-Pmp23 (50,5 kDa) et H6-Pmp23\* (22,3 kDa).** A. L'anticorps produit à partir de la protéine dénaturée H6-Pmp23\* ne reconnaît pas la protéine GST-Pmp23 (piste 1). B. et C. Les anticorps  $\alpha$ -Pmp23 de souris et  $\alpha$ -peptide I de lapin reconnaissent les deux protéines recombinantes (piste 1 et 2). D. l'anticorps  $\alpha$ -peptide II ne reconnaît pas la protéine dénaturée H6-Pmp23\* (piste 2).

A partir des western blots effectués sur les extraits cellulaires des deux souches R6 sauvage et mutée, six bandes sont détectées avec l'anticorps  $\alpha$ -H6-Pmp23\*. De même, les anticorps  $\alpha$ -peptide I et  $\alpha$ -peptide II ne sont pas spécifiques. Aucune détection de la protéine n'a été possible par western blot sur des extraits cellulaires de *S. pneumoniae* avec l'anticorps  $\alpha$ -Pmp23. La protéine contrôle PBP2b était, quant à elle, bien visible sur les mêmes extraits cellulaires avec des anticorps anti-PBP2b de lapin (données non présentées).

Ainsi, d'après ces expériences, l'anticorps qui semble être de meilleure qualité est l'anticorps  $\alpha$ -Pmp23, les trois autres manquant de spécificité. Tous ont cependant été testés en immunofluorescence sur des cellules de *S. pneumoniae* R6 de type sauvage et mutée.

Seul l'anticorps  $\alpha$ -H6-Pmp23\* donne un signal en immunofluorescence, mais ce marquage n'est pas spécifique. En effet, le sérum pré-immun de lapin donne un marquage similaire à celui de l'anticorps  $\alpha$ -H6-Pmp23\*. Alors que la protéine FtsZ marquant les étapes de la division cellulaire, est facilement observable, aucune détection de Pmp23 n'est possible avec les anticorps  $\alpha$ -peptides I et II ainsi que  $\alpha$ -Pmp23. Trois interprétations de ces résultats sont possibles, soit les concentrations en anticorps utilisées étaient trop faibles pour visualiser Pmp23 bien que différentes dilutions aient été testées jusqu'au 1/10, soit, Pmp23 est une protéine produite en très faible quantité par la bactérie et par conséquent le marquage n'est pas visible. La troisième hypothèse, peu probable d'après les résultats de western blots effectués en conditions dénaturantes sur les extraits cellulaires, reposerait sur le fait que Pmp23 interagisse avec d'autres protéines ce qui empêcherait les anticorps de la reconnaître dans la cellule. La protéine est cependant produite par la cellule puisque l'inactivation du gène correspondant induit un phénotype chez *S. pneumoniae*. Il serait intéressant d'étudier l'expression de cette protéine au cours de la croissance bactérienne par des études d'analyses transcriptionnelles par exemple.

## II. Recherche de l'activité de clivage du peptidoglycane

Du fait de l'instabilité de la protéine GST-Pmp23, chaque expérience tentée pour déterminer son activité a été réalisée dans les jours suivant sa purification. Les mucopeptides obtenus après digestion du peptidoglycane par GST-Pmp23 et la lysostaphine ont été séparés par RP-HPLC puis leur masse a été déterminée par des expériences de MALDI-TOF. De nombreuses expériences ont été réalisées, en utilisant deux gradients de tampons différents pour la séparation RP-HPLC, et diverses matrices pour l'analyse en MALDI-TOF. Pour chaque expérience, les contrôles de réaction suivants ont été traités en parallèle de GST-Pmp23 : tampon de purification, la protéine GST et le lysozyme de blanc d'oeuf de poulet (Sigma). Cependant, malgré tous nos efforts, nous n'avons pu détecter une activité enzymatique précise de GST-Pmp23 dans nos conditions expérimentales. Plusieurs hypothèses ont été émises pour tenter de comprendre cet échec. La première hypothèse serait liée à la sensibilité de la méthode : si l'activité de GST-Pmp23 est très faible, il est possible que les mucopeptides potentiellement générés par cette enzyme ne puissent être détectés. Une autre possibilité repose sur le fait que l'activité de la

protéine recombinante membranaire GST-Pmp23 est testée en présence de détergent. Ce détergent pourrait réduire fortement voire supprimer l'activité de Pmp23 en milieu liquide. L'activité de GST-Pmp23 était visible après renaturation sur gel SDS-PAGE dont la matrice polyacrylamide contient des cellules lyophilisées de *Micrococcus lysodeikticus* : le fait de passer par une étape d'électrophorèse permet de diminuer la concentration en détergent au niveau de la migration de la protéine. Enfin, la majorité des essais ont été faits en présence de peptidoglycane de *S. aureus*, nous ne pouvons omettre un manque de spécificité de GST-Pmp23 pour ce substrat.



## Conclusions et perspectives

La plupart des bactéries possède un composé extracellulaire qui leur est spécifique : le peptidoglycane. Les enzymes de la voie de biosynthèse de cet hétéropolymère sont des cibles thérapeutiques qui ont largement été validées par l'utilisation des  $\beta$ -lactamines. Face à l'accroissement de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez différentes espèces bactériennes, dont *S. pneumoniae*, il devient urgent de trouver de nouvelles cibles, spécifiques du monde bactérien et d'accès facile pour des antibiotiques. L'étude détaillée du métabolisme du peptidoglycane pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Les hydrolases du peptidoglycane sont des cibles potentielles car elles agissent très probablement de façon concertée avec les PBPs pour remodeler le peptidoglycane durant la croissance et la division cellulaire. Nous nous sommes intéressés aux enzymes de clivage du peptidoglycane de *S. pneumoniae*. Cette bactérie possède six hydrolases déjà caractérisées. Le rôle de la D,D-carboxypeptidase PBP3 dans la régulation de la division cellulaire a été clairement établi au laboratoire. Cette protéine membranaire permettrait la localisation des PBPs au cours de la synthèse de peptidoglycane. Quatre autres hydrolases, LytA, LytB, LytC et CbpD liant les résidus choline des acides teichoïques, se localiseraient plutôt sur les couches les plus externes du peptidoglycane. Un rôle dans la séparation des cellules filles en fin de division cellulaire des deux premières ainsi que de PcsB, une protéine possédant un peptide signal d'export a été mis en évidence. De plus, il a été montré que l'endopeptidase essentielle PcsB interviendrait dans la régulation de la biosynthèse du peptidoglycane.

Nous décrivons une nouvelle hydrolase du peptidoglycane Pmp23 (Pneumococcal membrane protein) dont la topologie est la suivante : une courte région cytoplasmique suivie d'un ancrage membranaire puis d'une importante région extracellulaire contenant le domaine PECACE (PEptidoglycan CARbohydrate Cleavage Enzyme). Nous mettons en évidence la présence exclusive de ce domaine dans les bactéries à Gram positif. Le domaine PECACE, prédit pour avoir un repliement tridimensionnel analogue au domaine catalytique de la transglycosylase lytique Slt70 d'*E. coli* et du lysozyme de type G d'oie, pourrait cliver la liaison glycosidique  $\beta(1-4)$  entre les résidus MurNAc et GlcNAc du peptidoglycane. L'analyse phénotypique d'une souche

de *S. pneumoniae* dont le gène *pmp23* a été inactivé et la mise en évidence d'une activité enzymatique de la protéine recombinante GST-Pmp23 permettent de proposer que Pmp23 est une hydrolase de la paroi cellulaire qui intervient dans le métabolisme du peptidoglycane au moment de la formation du septum au cours de la division cellulaire.

La composition de la paroi cellulaire diffère entre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ces dernières sont caractérisées par un peptidoglycane épais et l'absence de membrane externe. Ces différences engendrent des mécanismes de synthèse et de dégradation de la paroi divergents entre ces deux types de bactéries. Or, la recherche du domaine PECACE dans l'ensemble des organismes bactériens dont le génome a été séquencé a été infructueuse parmi les espèces à Gram négatif. Similairement, l'activité transglycosylase lytique a été caractérisée uniquement chez des bactéries à Gram négatif et chez les bactéries à Gram positif durant le processus de sporulation et de germination. Nous avons mentionné dans la présentation bibliographique qu'au moment de la sporulation, la composition du peptidoglycane du cortex diverge de celui présent durant la croissance végétative. Le cortex possède des résidus  $\delta$ -lactam muramiques ainsi que des résidus MurNAc substitués par un seul acide aminé L-alanine (1). Le métabolisme du peptidoglycane serait donc différent selon les phases de croissance des bactéries sporulantes. Aussi, les transglycosylases lytiques pourraient être associées au métabolisme du peptidoglycane des bactéries à Gram négatif ainsi qu'à celui du cortex des spores tandis que le domaine PECACE serait spécifiquement impliqué dans le clivage du peptidoglycane des bactéries à Gram positif.

L'observation en microscopie électronique de cellules d'une souche mutée *pmp23* présentant la formation de septa aberrants, multiples et mal localisés nous a conduit à proposer un rôle de Pmp23 dans la biosynthèse du peptidoglycane septal. Pmp23 possède d'ailleurs un ancrage membranaire qui lui permet d'accéder aux couches de peptidoglycane les plus proches de la membrane cytoplasmique, autrement dit, aux couches nouvellement synthétisées. Les protéines impliquées dans les étapes terminales de la synthèse du peptidoglycane, à savoir les PBPs, possèdent également une région transmembranaire. Comment, Pmp23 pourrait-elle orienter la formation du septum ? Cette enzyme interagirait-elle avec les enzymes de synthèses, les PBPs ? Plusieurs hypothèses ont été émises concernant la participation de Pmp23 dans la régulation de la

division cellulaire. Pmp23 pourrait cliver les brins de peptidoglycane nouvellement synthétisé à un site ne correspondant pas à l'emplacement du septum. Une autre hypothèse pourrait être l'implication de Pmp23 dans un complexe faisant intervenir les enzymes de synthèse septale. Pmp23 pourrait initier la synthèse septale en permettant le recrutement des PBPs. Il serait intéressant d'obtenir des anticorps dirigés contre Pmp23 de bonnes qualités afin de réaliser des expériences d'immunolocalisation. Cela nous permettrait d'avancer dans la compréhension du rôle de Pmp23 dans la régulation de la division cellulaire. En effet, nous pourrions décrire un comportement temporel de cette protéine au cours de la division cellulaire en effectuant un double marquage avec la protéine FtsZ, marqueur du cycle cellulaire. Nous pourrions aussi savoir si Pmp23 se co-localise avec certaines PBPs. Des études *in vitro* (chromatographie d'affinité ; immunoprécipitation ; résonance plasmonique de surface) ou *in vivo* (double hybride bactérien) d'interaction de Pmp23 et de protéines connues pour être impliquées dans la division permettraient également de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la synthèse de peptidoglycane septal.

La division cellulaire est un processus d'une grande complexité et sa régulation doit être finement contrôlée par l'intervention de nombreuses protéines comme par exemple la D,D-carboxypeptidase PBP3 et Pmp23 chez *S. pneumoniae*. PcsB est également une enzyme pneumococcale qui semble intervenir dans la biosynthèse de peptidoglycane au cours de la division. PcsB est une enzyme qui hydrolyserait la partie peptidique du peptidoglycane alors que Pmp23 hydrolyserait les chaînes glycanes. Aussi, ces deux enzymes pourraient agir de façon coordonnée dans la régulation de la synthèse du peptidoglycane septal. Dans la publication n°I, nous mentionnons l'existence de protéines modulaires possédant le domaine PECACE et un domaine supplémentaire connu pour hydrolyser le peptidoglycane. Chez un certain nombre d'espèces bactériennes, ce domaine était justement le domaine CHAP présent dans PcsB. Aussi, ces deux activités portées soit, par une seule enzyme soit, par deux enzymes différentes pourraient participer à la régulation du métabolisme du peptidoglycane des bactéries à Gram positif.

Pmp23 participant à la régulation de la division cellulaire pourrait-elle être considérée comme une cible thérapeutique éventuelle ? Suite à l'inactivation du gène codant pour Pmp23, un

phénotype intéressant a été observé : la sensibilité à la pénicilline G de la bactérie augmente. Quelques observations concernant l'effet bactériolytique des  $\beta$ -lactamines ont été rapportées ici afin de mieux comprendre ce phénotype. La mort de la bactérie et la lyse cellulaire, observées en présence d'antibiotiques, seraient deux événements distincts qui se succèderaient (Bayles, 2000; Moreillon *et al.*, 1990). Chez *S. pneumoniae*, l'inactivation de l'amidase LytA entraîne l'absence de lyse en présence d'une  $\beta$ -lactamine (Tomasz *et al.*, 1988). Il a donc été proposé que le déséquilibre entre l'action des synthétases et des hydrolases du peptidoglycane ou une dérégulation de l'activité autolytique pourrait conduire à la lyse bactérienne (Kitano and Tomasz, 1979; Tomasz *et al.*, 1988). Nous montrons ici qu'une souche mutée dans les gènes *lytA* et *pmp23* lyse en présence de pénicilline G. Comme la souche mutée uniquement dans le gène *pmp23* présente des défauts au niveau du site de division, nous émettons l'hypothèse que la lyse du double mutant provient directement de ces aberrations morphologiques. De plus, il a été montré que la lyse due aux  $\beta$ -lactamines chez *E. coli* était préférentiellement localisée aux sites de division, lieu de la synthèse septale (de Pedro *et al.*, 2002). De même, la mort due aux antibiotiques serait corrélée à la séparation des cellules chez *S. aureus* et résulterait d'une perforation locale du peptidoglycane au site septal incomplet ou manquant (Giesbrecht *et al.*, 1998; Holtje, 1995). Ainsi, même chez *S. pneumoniae*, la lyse induite par la présence de  $\beta$ -lactamines serait associée aux sites de division. Aussi, les enzymes impliquées dans les étapes de synthèse du peptidoglycane au cours de la division cellulaire constituent des cibles thérapeutiques potentielles. D'ailleurs, un effet similaire à l'augmentation de la sensibilité à la Pénicilline G, suite à l'inactivation du gène *pmp23*, a été observé chez *S. pneumoniae* en présence d'acide clavulanique, un inhibiteur spécifique de la D,D-carboxypeptidase non essentielle PBP3 : la Concentration Inhibitrice Minimale (CMI) en Pénicilline G a diminué d'un facteur quatre (Severin *et al.*, 1997).

Bien que le gène *pmp23* ne soit pas essentiel à la bactérie, la diminution de sensibilité à la pénicilline G d'une souche mutée au niveau de *pmp23* rend la nouvelle hydrolase de *S. pneumoniae* intéressante d'un point de vue thérapeutique. Il serait intéressant de déterminer la sensibilité à différents  $\beta$ -lactamines d'une souche résistante clinique dont le gène *pmp23* a été inactivé. Selon les résultats, Pmp23 pourrait être proposée comme cible d'un nouvel inhibiteur qui pourrait être utilisé en association avec des  $\beta$ -lactamines déjà connues.

Il n'est pas surprenant d'observer des défauts morphologiques associés à des souches mutées pour des enzymes impliquées dans le clivage du peptidoglycane. Cependant, ces aberrations morphologiques diffèrent selon la forme initiale des bactéries non mutées. En effet, en règle générale, les bactéries de formes cylindriques comme *E. coli* ou *B. subtilis* conservent l'aspect morphologique général de leurs cellules lorsqu'une ou plusieurs de leurs hydrolases sont mutées. Le plus souvent, il n'y a plus séparation des cellules filles et la bactérie présente un aspect filamenteux. Notons que les bactéries de formes cylindrique et spiralée possèdent des protéines de type « Mre » homologue aux protéines eucaryotes d'actine du cytosquelette qui sont nécessaires à la morphologie caractéristique de ces bactéries (Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005). Il n'a été trouvé aucun homologue de ces protéines chez les bactéries formant des coques. Or chez les coques, l'inactivation d'hydrolases conduit à des changements plus drastiques. C'est le cas pour les bactéries *N. gonorrhoeae* et *S. aureus* suite à l'inactivation de la transglycosylase lytique LtgC et de l'amidase Sle1 respectivement (Cloud and Dillard, 2004; Kajimura *et al.*, 2005). Chez *S. pneumoniae*, l'inactivation de la D,D-carboxypeptidase PBP3 et de l'hydrolase Pmp23 conduit également à la formation de septa anormaux (Schuster *et al.*, 1990). Chez ces bactéries mutées, des cellules plus volumineuses, plus rondes ou encore la formation de groupes de cellules sont présents. En absence de protéine de « type actine », les hydrolases pourraient jouer un rôle déterminant dans la forme bactérienne. Une division correcte serait la condition requise à une bonne morphologie, notamment chez les coques.

L'étude des hydrolases du peptidoglycane reste ouverte. Le plus souvent, ces enzymes sont étudiées soit par immunofluorescence soit par microscopie électronique à transmission mais rarement par combinaison des deux types d'expériences. Or les informations, issues de l'étude de la localisation cellulaire et obtenues à partir d'observations d'éventuelles aberrations morphologiques d'une souche mutée, qu'apportent ces deux méthodes d'étude, sont nécessaires à une meilleure compréhension globale de la fonction physiologique d'une protéine donnée. De plus, les enzymes de clivage du peptidoglycane ont longtemps été étudiées indépendamment les unes des autres. Pourtant, comme nous venons de le voir, il semblerait que plusieurs d'entre elles, avec des activités de clivage variées, interviennent au sein d'un même processus cellulaire. Une fois la caractérisation biochimique et fonctionnelle d'une protéine isolée effectuée, il devient inévitable d'approfondir son rôle dans son contexte global, en prenant en compte l'ensemble des protéines impliquées dans un processus physiologique.

## Bibliographie

Adu-Bobie, J., Lupetti, P., Brunelli, B., Granoff, D., Norais, N., Ferrari, G., Grandi, G., Rappuoli, R., and Pizza, M. (2004) GNA33 of *Neisseria meningitidis* is a lipoprotein required for cell separation, membrane architecture, and virulence. *Infect. Immun.* **72**: 1914-1919.

Anantharaman, V., and Aravind, L. (2003) Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biol.* **4**: R11.

Arbeloa, A., Hugonnet, J.E., Sentilhes, A.C., Josseaume, N., Dubost, L., Monsempes, C., Blanot, D., Brouard, J.P., and Arthur, M. (2004) Synthesis of mosaic peptidoglycan cross-bridges by hybrid peptidoglycan assembly pathways in gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* **279**: 41546-41556.

Atrih, A., Zollner, P., Allmaier, G., Williamson, M.P., and Foster, S.J. (1998) Peptidoglycan structural dynamics during germination of *Bacillus subtilis* 168 endospores. *J. Bacteriol.* **180**: 4603-4612.

Atrih, A., Bacher, G., Korner, R., Allmaier, G., and Foster, S.J. (1999) Structural analysis of *Bacillus megaterium* KM spore peptidoglycan and its dynamics during germination. *Microbiology* **145** (Pt 5): 1033-1041.

Atrih, A., and Foster, S.J. (2001) Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 364-372.

Atrih, A., and Foster, S.J. (2001) In vivo roles of the germination-specific lytic enzymes of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology* **147**: 2925-2932.

Balachandran, P., Hollingshead, S.K., Paton, J.C., and Briles, D.E. (2001) The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J. Bacteriol.* **183**: 3108-3116.

Bateman, A., and Rawlings, N.D. (2003) The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 234-237.

Bayles, K.W. (2000) The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol.* **8**: 274-278.

Bernadsky, G., Beveridge, T.J., and Clarke, A.J. (1994) Analysis of the sodium dodecyl sulfate-stable peptidoglycan autolysins of select gram-negative pathogens by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **176**: 5225-5232.

- Bernhardt, T.G., and de Boer, P.A. (2003) The Escherichia coli amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol. Microbiol.* **48**: 1171-1182.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D., and Paton, J.C. (1989) Contribution of autolysin to virulence of Streptococcus pneumoniae. *Infect. Immun.* **57**: 2324-2330.
- Blackburn, N.T., and Clarke, A.J. (2001) Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J. Mol. Evol.* **52**: 78-84.
- Blackman, S.A., Smith, T.J., and Foster, S.J. (1998) The role of autolysins during vegetative growth of Bacillus subtilis 168. *Microbiology* **144** (Pt 1): 73-82.
- Boland, F.M., Atrih, A., Chirakkal, H., Foster, S.J., and Moir, A. (2000) Complete spore-cortex hydrolysis during germination of Bacillus subtilis 168 requires SleB and YpeB. *Microbiology* **146** (Pt 1): 57-64.
- Boneca, I.G., Xu, N., Gage, D.A., de Jonge, B.L., and Tomasz, A. (1997) Structural characterization of an abnormally cross-linked muropeptide dimer that is accumulated in the peptidoglycan of methicillin- and cefotaxime-resistant mutants of Staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.* **272**: 29053-29059.
- Boneca, I.G. (2005) The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 46-53.
- Buist, G., Kok, J., Leenhouts, K.J., Dabrowska, M., Venema, G., and Haandrikman, A.J. (1995) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of Lactococcus lactis, a muramidase needed for cell separation. *J. Bacteriol.* **177**: 1554-1563.
- Burman, L.G., and Park, J.T. (1984) Molecular model for elongation of the murein sacculus of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **81**: 1844-1848.
- Cabeen, M.T., and Jacobs-Wagner, C. (2005) Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 601-610.
- Chirakkal, H., O'Rourke, M., Atrih, A., Foster, S.J., and Moir, A. (2002) Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in Bacillus subtilis endospore germination. *Microbiology* **148**: 2383-2392.
- Cloud, K.A., and Dillard, J.P. (2002) A lytic transglycosylase of Neisseria gonorrhoeae is involved in peptidoglycan-derived cytotoxin production. *Infect. Immun.* **70**: 2752-2757.
- Cloud, K.A., and Dillard, J.P. (2004) Mutation of a Single Lytic Transglycosylase Causes Aberrant Septation and Inhibits Cell Separation of Neisseria gonorrhoeae. *J. Bacteriol.* **186**: 7811-7814.

- de Jonge, B.L., Chang, Y.S., Gage, D., and Tomasz, A. (1992) Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein 2A. *J. Biol. Chem.* **267**: 11248-11254.
- De Las Rivas, B., Garcia, J.L., Lopez, R., and Garcia, P. (2002) Purification and Polar Localization of Pneumococcal LytB, a Putative Endo-beta-N-Acetylglucosaminidase: the Chain-Dispersing Murein Hydrolase. *J. Bacteriol.* **184**: 4988-5000.
- de Pedro, M.A., Holtje, J.V., and Schwarz, H. (2002) Fast lysis of *Escherichia coli* filament cells requires differentiation of potential division sites. *Microbiology* **148**: 79-86.
- de Pedro, M.A., Young, K.D., Holtje, J.V., and Schwarz, H. (2003) Branching of *Escherichia coli* cells arises from multiple sites of inert peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **185**: 1147-1152.
- Dessen, A., Di Guilmi, A.M., Vernet, T., and Dideberg, O. (2001) Molecular mechanisms of antibiotic resistance in gram-positive pathogens. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **1**: 63-77.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003) Functional characterization of penicillin-binding protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185**: 1650-1658.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003) The glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* catalyzes the polymerization of murein glycan chains. *J. Bacteriol.* **185**: 4418-4423.
- Dijkstra, A.J., Hermann, F., and Keck, W. (1995) Cloning and controlled overexpression of the gene encoding the 35 kDa soluble lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **366**: 115-118.
- Dijkstra, A.J., and Keck, W. (1996) Identification of new members of the lytic transglycosylase family in *Haemophilus influenzae* and *Escherichia coli*. *Microb. Drug. Resist.* **2**: 141-145.
- Dijkstra, A.J., and Keck, W. (1996) Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. Bacteriol.* **178**: 5555-5562.
- Dillard, J.P., and Seifert, H.S. (1997) A peptidoglycan hydrolase similar to bacteriophage endolysins acts as an autolysin in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **25**: 893-901.
- Dmitriev, B.A., Toukach, F.V., Schaper, K.J., Holst, O., Rietschel, E.T., and Ehlers, S. (2003) Tertiary structure of bacterial murein: the scaffold model. *J. Bacteriol.* **185**: 3458-3468.
- Dokter, W.H., Dijkstra, A.J., Koopmans, S.B., Stulp, B.K., Keck, W., Halie, M.R., and Vellenga, E. (1994) G(Anh)MTetra, a natural bacterial cell wall breakdown product, induces interleukin-1 beta and interleukin-6 expression in human monocytes. A study of the molecular mechanisms involved in inflammatory cytokine expression. *J. Biol. Chem.* **269**: 4201-4206.
- Dowson, C.G., Hutchison, A., Brannigan, J.A., George, R.C., Hansman, D., Linares, J., Tomasz, A., Smith, J.M., and Spratt, B.G. (1989) Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in



penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**: 8842-8846.

Dowson, C.G., Hutchison, A., Woodford, N., Johnson, A.P., George, R.C., and Spratt, B.G. (1990) Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 5858-5862.

Dowson, C.G., Coffey, T.J., Kell, C., and Whiley, R.A. (1993) Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **9**: 635-643.

Ehlert, K., Holtje, J.V., and Templin, M.F. (1995) Cloning and expression of a murein hydrolase lipoprotein from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**: 761-768.

Ehlert, K., and Holtje, J.V. (1996) Role of precursor translocation in coordination of murein and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6766-6771.

Engel, H., Kazemier, B., and Keck, W. (1991) Murein-metabolizing enzymes from *Escherichia coli*: sequence analysis and controlled overexpression of the *slt* gene, which encodes the soluble lytic transglycosylase. *J. Bacteriol.* **173**: 6773-6782.

Engel, H., Smink, A.J., van Wijngaarden, L., and Keck, W. (1992) Murein-metabolizing enzymes from *Escherichia coli*: existence of a second lytic transglycosylase. *J. Bacteriol.* **174**: 6394-6403.

Fernandez-Tornero, C., Lopez, R., Garcia, E., Gimenez-Gallego, G., and Romero, A. (2001) A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 1020-1024.

Fleming, T.J., Wallsmith, D.E., and Rosenthal, R.S. (1986) Arthropathic properties of gonococcal peptidoglycan fragments: implications for the pathogenesis of disseminated gonococcal disease. *Infect. Immun.* **52**: 600-608.

Foster, S.J. (1992) Analysis of the autolysins of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **174**: 464-470.

Fukushima, T., Kitajima, T., and Sekiguchi, J. (2005) A polysaccharide deacetylase homologue, PdaA, in *Bacillus subtilis* acts as an N-acetylmuramic acid deacetylase in vitro. *J. Bacteriol.* **187**: 1287-1292.

Garcia-Bustos, J.F., Chait, B.T., and Tomasz, A. (1987) Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **262**: 15400-15405.

Garcia-Bustos, J.F., and Dougherty, T.J. (1987) Alterations in peptidoglycan of *Neisseria gonorrhoeae* induced by sub-MICs of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 178-182.

- Garcia, P., Garcia, J.L., Garcia, E., and Lopez, R. (1989) Purification and characterization of the autolytic glycosidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**: 251-256.
- Garcia, P., Gonzalez, M.P., Garcia, E., Lopez, R., and Garcia, J.L. (1999) LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* **31**: 1275-1277.
- Garcia, P., Paz Gonzalez, M., Garcia, E., Garcia, J.L., and Lopez, R. (1999) The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol. Microbiol.* **33**: 128-138.
- Genereux, C., Dehareng, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Frere, J.M., and Joris, B. (2004) Mutational analysis of the catalytic centre of the *Citrobacter freundii* AmpD N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Biochem. J.* **377**: 111-120.
- Gerard, P., Vernet, T., and Zapun, A. (2002) Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. *J. Bacteriol.* **184**: 1925-1931.
- Ghuysen, J.M. (1968) Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* **32**: 425-464.
- Giesbrecht, P., Kersten, T., Maidhof, H., and Wecke, J. (1998) Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1371-1414.
- Glauner, B. (1988) Separation and quantification of mucopeptides with high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **172**: 451-464.
- Glauner, B., Holtje, J.V., and Schwarz, U. (1988) The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 10088-10095.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. (2000) Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**: 5690-5695.
- Granier, B., Jamin, M., Adam, M., Galleni, M., Lakaye, B., Zorzi, W., Grandchamps, J., Wilkin, J.M., Fraipont, C., Joris, B., and et al. (1994) Serine-type D-Ala-D-Ala peptidases and penicillin-binding proteins. *Methods Enzymol.* **244**: 249-266.
- Groicher, K.H., Firek, B.A., Fujimoto, D.F., and Bayles, K.W. (2000) The *Staphylococcus aureus* lrgAB operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **182**: 1794-1801.
- Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B., and Claverys, J.P. (2005) Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**: 8710-8715.

- Hakenbeck, R., and Kohiyama, M. (1982) Purification of penicillin-binding protein 3 from *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.* **127**: 231-236.
- Hansman, D., Devitt, L., Miles, H., and Riley, I. (1974) Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea. *Med. J. Aust.* **2**: 353-356.
- Harz, H., Burgdorf, K., and Holtje, J.V. (1990) Isolation and separation of the glycan strands from murein of *Escherichia coli* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **190**: 120-128.
- Heidrich, C., Templin, M.F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., de Pedro, M.A., and Holtje, J.V. (2001) Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**: 167-178.
- Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H., and Holtje, J.V. (2002) Effects of Multiple Deletions of Murein Hydrolases on Viability, Septum Cleavage, and Sensitivity to Large Toxic Molecules in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 6093-6099.
- Henriques Normark, B., and Normark, S. (2002) Antibiotic tolerance in pneumococci. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**: 613-622.
- Holtje, J.V., and Tomasz, A. (1975) Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of *Pneumococcus*. *J. Biol. Chem.* **250**: 6072-6076.
- Holtje, J.V., and Tuomanen, E.I. (1991) The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections in vivo. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 441-454.
- Holtje, J.V. (1995) From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **164**: 243-254.
- Holtje, J.V. (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 181-203.
- Holtje, J.V., and Heidrich, C. (2001) Enzymology of elongation and constriction of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Biochimie* **83**: 103-108.
- Hoppner, C., Liu, Z., Domke, N., Binns, A.N., and Baron, C. (2004) VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **186**: 1415-1422.
- Horsburgh, G.J., Atrih, A., and Foster, S.J. (2003) Characterization of LytH, a differentiation-associated peptidoglycan hydrolase of *Bacillus subtilis* involved in endospore cortex maturation. *J. Bacteriol.* **185**: 3813-3820.
- Horsburgh, G.J., Atrih, A., Williamson, M.P., and Foster, S.J. (2003) LytG of *Bacillus subtilis* is a novel peptidoglycan hydrolase: the major active glucosaminidase. *Biochemistry* **42**: 257-264.

- Hourdou, M.L., Guinand, M., Vacheron, M.J., Michel, G., Denoroy, L., Duez, C., Englebert, S., Joris, B., Weber, G., and Ghuysen, J.M. (1993) Characterization of the sporulation-related gamma-D-glutamyl-(L)meso-diaminopimelic-acid-hydrolysing peptidase I of *Bacillus sphaericus* NCTC 9602 as a member of the metallo(zinc) carboxypeptidase A family. Modular design of the protein. *Biochem. J.* **292** (Pt 2): 563-570.
- Ishikawa, S., Hara, Y., Ohnishi, R., and Sekiguchi, J. (1998) Regulation of a new cell wall hydrolase gene, *cwlF*, which affects cell separation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**: 2549-2555.
- Jacobs, C., Huang, L.J., Bartowsky, E., Normark, S., and Park, J.T. (1994) Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *Embo. J.* **13**: 4684-4694.
- Jacobs, C., Joris, B., Jamin, M., Klarsov, K., Van Beeumen, J., Mengin-Lecreulx, D., van Heijenoort, J., Park, J.T., Normark, S., and Frere, J.M. (1995) AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol. Microbiol.* **15**: 553-559.
- Kajimura, J., Fujiwara, T., Yamada, S., Suzawa, Y., Nishida, T., Oyamada, Y., Hayashi, I., Yamagishi, J., Komatsuzawa, H., and Sugai, M. (2005) Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **58**: 1087-1101.
- Karamanos, Y. (1997) Endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidases and their potential substrates: structure/function relationships. *Res. Microbiol.* **148**: 661-671.
- Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E., and Havarstein, L.S. (2005) Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J. Bacteriol.* **187**: 4338-4345.
- Kitano, K., and Tomasz, A. (1979) Triggering of autolytic cell wall degradation in *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother* **16**: 838-848.
- Koch, A.L., and Doyle, R.J. (1985) Inside-to-outside growth and turnover of the wall of gram-positive rods. *J. Theor. Biol.* **117**: 137-157.
- Koonin, E.V., and Rudd, K.E. (1994) A conserved domain in putative bacterial and bacteriophage transglycosylases. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 106-107.
- Koraimann, G. (2003) Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 2371-2388.
- Korsak, D., Liebscher, S., and Vollmer, W. (2005) Susceptibility to Antibiotics and {beta}-Lactamase Induction in Murein Hydrolase Mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 1404-1409.

- Korza, H.J., and Bochtler, M. (2005) Pseudomonas aeruginosa LD-carboxypeptidase, a serine peptidase with a Ser-His-Glu triad and a nucleophilic elbow. *J. Biol. Chem.* **280**: 40802-40812.
- Koval, S.F., and Hynes, S.H. (1991) Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by Bdellovibrio bacteriovorus. *J. Bacteriol.* **173**: 2244-2249.
- Kraft, A.R., Templin, M.F., and Holtje, J.V. (1998) Membrane-bound lytic endotransglycosylase in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **180**: 3441-3447.
- Kraft, A.R., Prabhu, J., Ursinus, A., and Holtje, J.V. (1999) Interference with murein turnover has no effect on growth but reduces beta-lactamase induction in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **181**: 7192-7198.
- Krall, L., Wiedemann, U., Unsin, G., Weiss, S., Domke, N., and Baron, C. (2002) Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of Agrobacterium tumefaciens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**: 11405-11410.
- Krueger, J.M., Pappenheimer, J.R., and Karnovsky, M.L. (1982) Sleep-promoting effects of muramyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**: 6102-6106.
- Kuhn, M., and Goebel, W. (1989) Identification of an extracellular protein of Listeria monocytogenes possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immun.* **57**: 55-61.
- Kuroda, A., and Sekiguchi, J. (1991) Molecular cloning and sequencing of a major Bacillus subtilis autolysin gene. *J. Bacteriol.* **173**: 7304-7312.
- Laurans, G., Murbach, V., Cattier, B., Chomarat, M., Cottin, J., Demachy, M., Dupont, M., Fauchère, J., Fosse, T., Laaberki, M., Lemozy, J., Maugein, J., Péchinot, A., Ploy, M., Romaszko, J., Roussel-Delvallez, M., Vaucel, M.V.J., Vernet-Garnier, V., Weber, M., and Chardon, H. (2001) Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des pneumocoques isolés en situation pathogène en France en 1999. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* **33**.
- Leclerc, D., and Asselin, A. (1989) Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* **35**: 749-753.
- Lenz, L.L., Mohammadi, S., Geissler, A., and Portnoy, D.A. (2003) SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes Listeria monocytogenes pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 12432-12437.
- Lewis, K. (2000) Programmed death in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 503-514.
- Llosa, M., Zupan, J., Baron, C., and Zambryski, P. (2000) The N- and C-terminal portions of the Agrobacterium VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. *J. Bacteriol.* **182**: 3437-3445.

- Lommatzsch, J., Templin, M.F., Kraft, A.R., Vollmer, W., and Holtje, J.V. (1997) Outer membrane localization of murein hydrolases: MltA, a third lipoprotein lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 5465-5470.
- Lopez, R., Gonzalez, M.P., Garcia, E., Garcia, J.L., and Garcia, P. (2000) Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Res. Microbiol.* **151**: 437-443.
- Manna, A.C., Ingavale, S.S., Maloney, M., van Wamel, W., and Cheung, A.L. (2004) Identification of sarV (SA2062), a new transcriptional regulator, is repressed by SarA and MgrA (SA0641) and involved in the regulation of autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**: 5267-5280.
- Margot, P., Wahlen, M., Gholamhoseinian, A., Piggot, P., Karamata, D., and Gholamhuseinian, A. (1998) The lytE gene of *Bacillus subtilis* 168 encodes a cell wall hydrolase. *J. Bacteriol.* **180**: 749-752.
- Massidda, O., Anderluzzi, D., Friedli, L., and Feger, G. (1998) Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **144** (Pt 11): 3069-3078.
- Moreillon, P., Markiewicz, Z., Nachman, S., and Tomasz, A. (1990) Two bactericidal targets for penicillin in pneumococci: autolysis-dependent and autolysis-independent killing mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 33-39.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003) Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* **50**: 845-855.
- Morlot, C., Noirclerc-Savoye, M., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2004) The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **51**: 1641-1648.
- Moscoso, M., and Claverys, J.P. (2004) Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol. Microbiol.* **54**: 783-794.
- Mosser, J.L., and Tomasz, A. (1970) Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J. Biol. Chem.* **245**: 287-298.
- Mushegian, A.R., Fullner, K.J., Koonin, E.V., and Nester, E.W. (1996) A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**: 7321-7326.

Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R.M., and Kutsukake, K. (1999) Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**: 1555-1561.

Ng, W.L., Kazmierczak, K.M., and Winkler, M.E. (2004) Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Mol. Microbiol.* **53**: 1161-1175.

Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y.M., Suginaka, H., and Tomasz, A. (1995) A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**: 285-289.

Ouzari, H., Cherif, A., and Mora, D. (2002) Autolytic phenotype of *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional Tunisian dairy products. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 812-820.

Pagliero, E., Chesnel, L., Hopkins, J., Croize, J., Dideberg, O., Vernet, T., and Di Guilmi, A.M. (2004) Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1848-1855.

Paik, J., Kern, I., Lurz, R., and Hakenbeck, R. (1999) Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.* **181**: 3852-3856.

Parquet, C., Flouret, B., Leduc, M., Hirota, Y., and van Heijenoort, J. (1983) N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase of *Escherichia coli* K12. Possible physiological functions. *Eur. J. Biochem.* **133**: 371-377.

Peterson, S., Cline, R.T., Tettelin, H., Sharov, V., and Morrison, D.A. (2000) Gene expression analysis of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulons by use of DNA microarrays. *J. Bacteriol.* **182**: 6192-61202.

Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L., and Simon, D. (1998) Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **66**: 5620-5629.

Popham, D.L., Helin, J., Costello, C.E., and Setlow, P. (1996) Analysis of the peptidoglycan structure of *Bacillus subtilis* endospores. *J. Bacteriol.* **178**: 6451-6458.

Recsei, P.A., Gruss, A.D., and Novick, R.P. (1987) Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**: 1127-1131.

Reid, C.W., Blackburn, N.T., Legaree, B.A., Auzanneau, F.I., and Clarke, A.J. (2004) Inhibition of membrane-bound lytic transglycosylase B by NAG-thiazoline. *FEBS Lett.* **574**: 73-79.

Rice, K.C., and Bayles, K.W. (2003) Death's toolbox: examining the molecular components of bacterial programmed cell death. *Mol. Microbiol.* **50**: 729-738.

- Rigden, D.J., Jedrzejewski, M.J., and Galperin, M.Y. (2003) Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of gamma-D,L-glutamate-specific amidohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 230-234.
- Romeis, T., and Holtje, J.V. (1994) Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 21603-21607.
- Ronda, C., Garcia, J.L., Garcia, E., Sanchez-Puelles, J.M., and Lopez, R. (1987) Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.* **164**: 621-624.
- Sanchez-Puelles, J.M., Ronda, C., Garcia, J.L., Garcia, P., Lopez, R., and Garcia, E. (1986) Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur. J. Biochem.* **158**: 289-293.
- Santos, J.M., Lobo, M., Matos, A.P., De Pedro, M.A., and Arraiano, C.M. (2002) The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **45**: 1729-1740.
- Schuster, C., Dobrinski, B., and Hakenbeck, R. (1990) Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *J. Bacteriol.* **172**: 6499-6505.
- Severin, A., Schuster, C., Hakenbeck, R., and Tomasz, A. (1992) Altered murein composition in a DD-carboxypeptidase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **174**: 5152-5155.
- Severin, A., Severina, E., and Tomasz, A. (1997) Abnormal physiological properties and altered cell wall composition in *Streptococcus pneumoniae* grown in the presence of clavulanic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 504-510.
- Shida, T., Hattori, H., Ise, F., and Sekiguchi, J. (2000) Overexpression, purification, and characterization of *Bacillus subtilis* N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase CwlC. *Biosci. i Biotechnol. Biochem.* **64**: 1522-1525.
- Smith, A.M., and Klugman, K.P. (1995) Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 859-867.
- Smith, T.J., Blackman, S.A., and Foster, S.J. (2000) Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* **146**: 249-262.
- Steen, A., Buist, G., Horsburgh, G.J., Venema, G., Kuipers, O.P., Foster, S.J., and Kok, J. (2005) *AcmA* of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *Febs J.* **272**: 2854-2868.
- Strynadka, N.C., and James, M.N. (1996) Lysozyme: a model enzyme in protein crystallography. *Exs.* **75**: 185-222.



- Sugai, M., Akiyama, T., Komatsuzawa, H., Miyake, Y., and Suginaka, H. (1990) Characterization of sodium dodecyl sulfate-stable *Staphylococcus aureus* bacteriolytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **172**: 6494-6498.
- Sun, Y.H., Bakshi, S., Chalmers, R., and Tang, C.M. (2000) Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat. Med.* **6**: 1269-1273.
- Takahashi, J., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Nishida, T., Labischinski, H., Fujiwara, T., Ohara, M., Yamagishi, J., and Sugai, M. (2002) Molecular characterization of an *atl* null mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* **46**: 601-612.
- Templin, M.F., Edwards, D.H., and Holtje, J.V. (1992) A murein hydrolase is the specific target of bulgecin in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 20039-20043.
- Templin, M.F., Ursinus, A., and Holtje, J.V. (1999) A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. *Embo J.* **18**: 4108-4117.
- Thunnissen, A.M., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., and Dijkstra, B.W. (1995) Structure of the 70-kDa soluble lytic transglycosylase complexed with bulgecin A. Implications for the enzymatic mechanism. *Biochemistry* **34**: 12729-12737.
- Tomasz, A., Moreillon, P., and Pozzi, G. (1988) Insertional inactivation of the major autolysin gene of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **170**: 5931-5934.
- Tuomanen, E., Hengstler, B., Zak, O., and Tomasz, A. (1986) Induction of meningeal inflammation by diverse bacterial cell walls. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **5**: 682-684.
- Uehara, T., Suefuji, K., Valbuena, N., Meehan, B., Donegan, M., and Park, J.T. (2005) Recycling of the anhydro-N-acetylmuramic acid derived from cell wall murein involves a two-step conversion to N-acetylglucosamine-phosphate. *J. Bacteriol.* **187**: 3643-3649.
- Ursinus, A., and Holtje, J.V. (1994) Purification and properties of a membrane-bound lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 338-343.
- van Asselt, E.J., Dijkstra, A.J., Kalk, K.H., Takacs, B., Keck, W., and Dijkstra, B.W. (1999) Crystal structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 reveals a lysozyme-like catalytic domain with an EF-hand. *Structure Fold Des.* **7**: 1167-1180.
- van Asselt, E.J., and Dijkstra, B.W. (1999) Binding of calcium in the EF-hand of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 is important for stability. *FEBS Lett.* **458**: 429-435.
- van Asselt, E.J., Kalk, K.H., and Dijkstra, B.W. (2000) Crystallographic studies of the interactions of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 with peptidoglycan. *Biochemistry* **39**: 1924-1934.
- van Heijenoort, J. (2001) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**: 25R-36R.

- van Straaten, K.E., Dijkstra, B.W., Vollmer, W., and Thunnissen, A.M. (2005) Crystal structure of MltA from Escherichia coli reveals a unique lytic transglycosylase fold. *J. Mol. Biol.* **352**: 1068-1080.
- Ward, J.B. (1973) The chain length of the glycans in bacterial cell walls. *Biochem. J.* **133**: 395-398.
- Vollmer, W., von Rechenberg, M., and Holtje, J.V. (1999) Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of Escherichia coli. *J Biol Chem* **274**: 6726-6734.
- Vollmer, W., and Tomasz, A. (2000) The pgdA gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in Streptococcus pneumoniae. *J. Biol. Chem.* **275**: 20496-20501.
- Vollmer, W., and Tomasz, A. (2002) Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in Streptococcus pneumoniae. *Infect. Immun.* **70**: 7176-7178.
- von Rechenberg, M., Ursinus, A., and Holtje, J.V. (1996) Affinity chromatography as a means to study multienzyme complexes involved in murein synthesis. *Microb. Drug. Resist.* **2**: 155-157.
- Votsch, W., and Templin, M.F. (2000) Characterization of a beta -N-acetylglucosaminidase of Escherichia coli and elucidation of its role in muropeptide recycling and beta -lactamase induction. *J. Biol. Chem.* **275**: 39032-39038.
- Walderich, B., and Holtje, J.V. (1991) Subcellular distribution of the soluble lytic transglycosylase in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **173**: 5668-5676.
- Wientjes, F.B., Pas, E., Taschner, P.E., and Woldringh, C.L. (1985) Kinetics of uptake and incorporation of meso-diaminopimelic acid in different Escherichia coli strains. *J. Bacteriol.* **164**: 331-337.
- Xu, N., Huang, Z.H., de Jonge, B.L., and Gage, D.A. (1997) Structural characterization of peptidoglycan muropeptides by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry and postsorce decay analysis. *Anal. Biochem.* **248**: 7-14.
- Yamada, S., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Nakashima, S., Oshida, T., Matsumoto, A., and Suginaka, H. (1996) An autolysin ring associated with cell separation of Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* **178**: 1565-1571.
- Yamamoto, H., Kurosawa, S., and Sekiguchi, J. (2003) Localization of the vegetative cell wall hydrolases LytC, LytE, and LytF on the Bacillus subtilis cell surface and stability of these enzymes to cell wall-bound or extracellular proteases. *J. Bacteriol.* **185**: 6666-6677.
- Yem, D.W., and Wu, H.C. (1976) Purification and properties of beta-N-acetylglucosaminidase from Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **125**: 324-331.

## **Annexe : publication**

Pagliero E, Chesnel L, Hopkins J, Croize J, Dideberg O, Vernet T, Di Guilmi AM.(2004). Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in beta-lactam resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 48(5):1848-1855.

## Biochemical Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Penicillin-Binding Protein 2b and Its Implication in $\beta$ -Lactam Resistance

Estelle Pagliero,<sup>1</sup> Laurent Chesnel,<sup>1</sup> Julie Hopkins,<sup>2</sup> Jacques Croizé,<sup>3</sup>  
Otto Dideberg,<sup>2</sup> Thierry Vernet,<sup>1\*</sup> and Anne Marie Di Guilmi<sup>1</sup>

Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules,<sup>1</sup> and Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire,<sup>2</sup>  
Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CEA-CNRS UMR 5075-UJF), 38027 Grenoble  
Cedex 1, and Service de Bactériologie et Virologie, Centre Hospitalier Universitaire,  
38043 Grenoble Cedex 09,<sup>3</sup> France

Received 8 September 2003/Returned for modification 14 December 2003/Accepted 29 January 2004

Extensive use of  $\beta$ -lactam antibiotics has led to the selection of pathogenic streptococci resistant to  $\beta$ -lactams due to modifications of the penicillin-binding proteins (PBPs). PBP2b from *Streptococcus pneumoniae* is a monofunctional (class B) high-molecular-weight PBP catalyzing the transpeptidation between adjacent stem peptides of peptidoglycan. The transpeptidase domain of PBP2b isolated from seven clinical resistant (CR) strains contains 7 to 44 amino acid changes over the sequence of PBP2b from the R6  $\beta$ -lactam-sensitive strain. We show that the extracellular soluble domains of recombinant PBP2b proteins (PBP2b\*) originating from these CR strains have an in vitro affinity for penicillin G that is reduced by up to 99% from that of the R6 strain. The Thr446Ala mutation is always observed in CR strains and is close to the key conserved motif (S<sub>443</sub>SN). The Thr446Ala mutation in R6 PBP2b\* displays a 60% reduction in penicillin G affinity in vitro compared to that for the wild-type protein. A recombinant R6 strain expressing the R6 PBP2b Thr446Ala mutation is twofold less sensitive to piperacillin than the parental *S. pneumoniae* strain. Analysis of the Thr446Ala mutation in the context of the PBP2b CR sequences revealed that its influence depends upon the presence of other unidentified mutations.

The high-molecular-weight (high- $M_r$ ) penicillin-binding proteins (PBPs) carry out the extracellular steps of peptidoglycan synthesis. These enzymes catalyze the glycosyltransferase reaction leading to the polymerization of the glycan chains and the transpeptidation (TP) activity establishing a covalent bond between two juxtaposed peptides (3, 15, 32). *Streptococcus pneumoniae* class A high- $M_r$  PBPs (PBP1a, PBP1b, and PBP2a) are bifunctional enzymes bearing both activities, whereas class B high- $M_r$  PBPs (PBP2b and PBP2x) have so far only been associated with the TP activity (15). Due to their structural similarity to the natural substrates, the D-Ala-D-Ala stem peptides,  $\beta$ -lactam molecules inhibit the TP reaction leading to bacterial cell lysis (35).

*S. pneumoniae* is a major human pathogen and the causative agent of ear infections in children, as well as meningitis and pneumonia. Extensive use of  $\beta$ -lactam antibiotics over the last 4 decades has led to the selection of pathogenic streptococci resistant to their action. The resistance to  $\beta$ -lactams in *S. pneumoniae* results from a decreased affinity of PBPs for the antibiotics. This phenotype results from genetic reshuffling. Mosaic genes encoding PBPs with lower affinity for  $\beta$ -lactams have been generated by homologous recombination events with other streptococcal species (18). The mosaicity of the pneumococcal *pbp2b* gene has been well established in penicillin clinical resistant (CR) isolates as resulting from recom-

bination events between *S. pneumoniae* and *Streptococcus mitis* (8–10). DNA sequence analysis has produced evidence that, under clinical and laboratory conditions, mutants of the *pbp2x* and *pbp2b* genes are the first to be selected upon treatment with cefotaxime and piperacillin, respectively, indicating that PBP2x and PBP2b are primary resistance determinants for these antibiotics (22, 29).

To characterize the biochemical properties of PBP2b, we have expressed the periplasmic domain of PBP2b from the *S. pneumoniae* R6 sensitive strain (PBP2b\*R6) and from seven CR isolates (PBP2b\*CR). These latter proteins show a marked reduction in affinity for penicillin G and, when recombined in the R6 strain, significantly increase the MIC of piperacillin for the host strain. The preponderance of the Thr446Ala mutation in clinical strains, as well as its juxtaposition to the key motif (S<sub>443</sub>SN) of the PBP TP function, led us to investigate the role of this mutation in more detail. The Thr446Ala mutation lowers the affinity for  $\beta$ -lactams and may thus play a role in the development of antibiotic resistance.

### MATERIALS AND METHODS

**Pneumococcal strains.** Seven clinical pneumococcal strains were isolated in the Bacteriology Laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble (Grenoble, France): one penicillin-sensitive strain for which the penicillin G MIC was  $\leq 0.06$   $\mu\text{g/ml}$ , two intermediate sensitive strains for which the penicillin G MICs were between 0.12 and 1  $\mu\text{g/ml}$ , and four resistant strains for which the penicillin G MICs were  $> 1$   $\mu\text{g/ml}$ . The R6 strain of *S. pneumoniae* (MIC of penicillin G,  $< 0.016$   $\mu\text{g/ml}$ ) was used as the penicillin-susceptible reference strain. *S. pneumoniae* strains were grown at 37°C in an atmosphere of 95% air-5% CO<sub>2</sub> on Columbia blood agar plates (bioMérieux). Clones were isolated, and overnight cultures were stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

\* Corresponding author. Mailing address: Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. Phone: 33-(0)4 38 78 96 81. Fax: 33-(0)4 38 78 54 94. E-mail: vernet@ibs.fr.

**Genomic DNA isolation from *S. pneumoniae* strains.** The same protocol was used for the unencapsulated R6 strain of *S. pneumoniae* and the pneumococcal clinical isolates. The various strains were anaerobically propagated in glucose-buffered broth (Bio-Rad) for 16 h at 30°C. Genomic DNA was extracted from 5 ml of culture with the High Pure PCR template preparation kit (Roche) following the manufacturer's instructions; 100 ng of genomic DNA was recovered in 200  $\mu$ l of water and was used as a template for PCR amplification of the *pbp2b* genes.

**Sequencing of *pbp2b* genes.** A 1,360-kb segment of *pbp2b*, corresponding to the TP domain, was amplified using Vent polymerase (New England Biolabs). The upstream primer was 5'-<sub>823</sub>ACCTTACAAGGAAAACGCTCGG<sub>844</sub>-3', and the downstream primer, which annealed to the 3' noncoding regions of *pbp2b* genes, was 5'-CATCCCAATCGTATAAAAGGCC-3'. The PCR products were directly sequenced by Genome Express (Grenoble, France).

**Cloning of the *pbp2b*\* gene from the *S. pneumoniae* R6 strain.** Genomic DNA from the R6 strain of *S. pneumoniae* was used as a template to amplify the complete *pbp2b* gene, i.e., containing the cytoplasmic portion, the transmembrane anchor, and the periplasmic domain. Primers were designed for the PCR amplification: 5'-<sub>3</sub>CGCATATGAGAAAATTTAACAGCATTC<sub>23</sub>-3' and 5'-<sub>2041</sub>CGCTCGAGGTTTCATTGGATGGTATTTT<sub>2021</sub>-3', which contained the restriction sites NdeI and XhoI (underlined), respectively. Amplification by PCR was performed using the following reaction mix: 1  $\mu$ M each oligonucleotide, 1  $\mu$ M dNTP, 60  $\mu$ g of DNA template/ml, and 6 mM MgCl<sub>2</sub>. Reactions used 4 U of Vent DNA polymerase (New England Biolabs) for 25 cycles as follows: 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, and 2.5 min at 72°C. A PCR product of 2 kb was produced, corresponding to the expected size of the *pbp2b* gene (2,044 bp). A step subcloning the *pbp2b* gene into the pCR-Script vector (Stratagene) was performed by following the manufacturer's instructions. The *pbp2b* gene was subcloned into a pET30b<sup>+</sup> vector (Novagen) to give the construct pET30b/*pbp2b*R6. This construct encodes the complete membrane-associated form of PBP2b with a C-terminally linked His<sub>6</sub> tag. This construct was entirely sequenced (Genome Express) to confirm that no mutations had been introduced during PCR.

From the construct pET30b/*pbp2b*R6, site-directed mutagenesis was performed to remove the first 34 amino acids, which correspond to the N-terminal membrane anchor of PBP2b and the short cytoplasmic region. The resulting construct, pET30b/*pbp2b*\*R6, allows the expression of the periplasmic form of the PBP2b protein (PBP2b\*) C-terminally fused to a His<sub>6</sub> tag.

For the construct pET30b/*pbp2b*\*R6, site-directed mutagenesis at position 446 was performed to mutate the codon Thr into Ala with a Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene), leading to the construct pET30b/*pbp2b*\*R6Thr446Ala.

**Cloning of *pbp2b*\* genes from *S. pneumoniae* clinical isolates.** Genomic DNA from each clinical isolate of *S. pneumoniae* was used as a template to amplify the periplasmic form of the *pbp2b* gene (*pbp2b*\*), i.e., deleted from the cytoplasmic portion and the transmembrane anchor. The upstream (5'-<sub>103</sub>CGCGGATCCCAGGTTTGAACAAGGATTTTACGAAAAAAGCTA<sub>138</sub>-3') and downstream (5'-<sub>2041</sub>CCGCTCGAGAGCATAATTTCTTCTAATTCATTGGATGGTATTTT<sub>2080</sub>-3') primers had BamHI and XhoI sites (underlined), respectively. PCR products, digested with BamHI and XhoI, were cloned into pGEX-4T1 (Amersham Biosciences). All cloned *pbp2b*\* genes were sequenced by Genome Express, and the constructs were called pGEX-4T1/*pbp2b*\*5023, pGEX-4T1/*pbp2b*\*5259, pGEX-4T1/*pbp2b*\*4935, pGEX-4T1/*pbp2b*\*5245, pGEX-4T1/*pbp2b*\*4790, pGEX-4T1/*pbp2b*\*5268, pGEX-4T1/*pbp2b*\*5204, and in a more general way, pGEX-4T1/*pbp2b*\*CR.

**Homologous recombination of *pbp2b*\* genes in the *S. pneumoniae* R6 strain.** R6 strain cells were made competent with a C-medium culture supplemented with 0.18% albumin at 8%. Upon achieving a culture with an optical density at 620 nm (OD<sub>620</sub>) of 0.15, 1-ml aliquots were added to 20% glycerol and frozen at -80°C. Competent cells were diluted 1:10 in C-medium supplemented with 0.18% albumin at 8% for a final volume of 1 ml. Fifty nanograms of plasmid DNA carrying native or mutated *pbp2b*\* genes was added for 30 min at 30°C. After a subsequent incubation for 2 h at 37°C, 100  $\mu$ l of cell suspension aliquots were deposited on an empty petri dish overlaid with 20 ml of blood agar gelose (Columbia blood agar base EH; DIFCO) containing 4% horse blood (Eurobio) and the antibiotics at various concentrations. After incubation at 37°C for 18 h, three clones were isolated from each transformation, and the MICs of penicillin G and piperacillin were measured. Homologous recombination was verified for one selected clone from each transformation by sequencing the periplasmic region of the *pbp2b* gene amplified by PCR.

**MIC testing.** For each recombinant strain, the MIC of penicillin G and piperacillin was determined using the Etest method. After overnight growth, Mueller-Hinton plates were inoculated, and penicillin G or piperacillin (0.016 to 256

$\mu$ g/ml) Etest strips (AB Biodisk) were laid. Plates were incubated for 18 to 24 h before the MICs were read where the ellipse of growth inhibition intersects the strip. MICs were measured independently between three and six times. When different discrete values were measured, the results were expressed as a range of the maximal and minimal values.

**Expression and purification of the different forms of PBP2b\* proteins. (i) Purification of PBP2b\*R6 and PBP2b\*R6Thr446Ala.** An overnight culture of an *Escherichia coli* BL21(DE3) expression strain transformed with plasmid pET30b/*pbp2b*\*R6 was used to inoculate (1:50) 1 liter of Lennox-LB broth (LB) medium supplemented with 30  $\mu$ g of kanamycin/ml. Upon achieving a culture with an OD<sub>600</sub> of 1 in LB medium at 37°C, protein expression was induced with 1 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) while incubating for 16 h at 15°C. Purification steps were all performed either at 4°C or on ice. Cells were spun at 6,000  $\times$  g for 15 min, and the pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)–200 mM NaCl–50 mM imidazole containing 1  $\mu$ g of aprotinin/ml, 1  $\mu$ g of leupeptin/ml, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Cell lysis was achieved by sonication, and the soluble fraction was obtained by centrifugation at 39,200  $\times$  g for 20 min. The supernatant was loaded at a flow rate of 1 ml/min onto a 10-ml chelating Sepharose column (Amersham Biosciences) equilibrated in buffer A (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 200 mM NaCl, 50 mM imidazole). The resin was washed with 10 column volumes of buffer A. Steps of 30 ml of increasing concentrations of imidazole (115 mM, 130 mM, and 175 mM) were used to elute PBP2b\*. Fractions containing PBP2b\* (115 mM imidazole elution step) were pooled and loaded onto a Sephadex G75 gel filtration column (Amersham Biosciences) previously equilibrated in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)–200 mM NaCl at a flow rate of 0.7 ml/min.

**(ii) Purification of PBP2b\*CR.** An overnight culture of an *E. coli* DH5 $\alpha$  strain transformed with the different pGEX-4T1/*pbp2b*\*CR plasmids was used to inoculate (1:50) 1 liter of LB medium supplemented with 100  $\mu$ g of ampicillin/ml. Upon achieving a culture with an OD<sub>600</sub> of 1 in LB medium at 37°C, protein expression was induced with 1 mM IPTG while incubating for 16 h at 15°C. Cells lysis was performed by sonication in buffer B (Tris-HCl [pH 8.0], 200 mM NaCl, 1 mM EDTA). The supernatant was loaded at a flow rate of 1 ml/min onto a 7-ml glutathione Sepharose column (Amersham Biosciences). The fusion proteins glutathione S-transferase (GST)-PBP2b\* were eluted with 10 mM reduced glutathione (Roche) in buffer B and extensively dialyzed against buffer B. The fusion proteins were cleaved in the presence of 100 U of thrombin (Sigma) for 1 h 30 min at room temperature. Thrombin was inhibited by 1 mM PMSF, the protein solution was loaded onto the glutathione Sepharose column in order to retain GST, and the PBP2b\*CR proteins were collected in the subsequent flow.

**$\beta$ -lactam binding assays.** The titration of PBP was performed using [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin (20 Ci/mmol, 1 mCi/ml; Amersham Biosciences). Purified PBP2b\*R6 (1  $\mu$ M) in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)–200 mM NaCl was incubated at 37°C with various concentrations of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin for 15 min. The samples were then subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin bound to proteins was monitored. The gel was stained with Coomassie blue, destained, incubated with Amplify<sup>a</sup> (Amersham Biosciences), dried, and either exposed to film for 16 h or cut around the protein bands. The radioactivity of the gel slice was measured using a liquid scintillation analyzer (Packard model 2100TR) after mixing with 5 ml of liquid scintillation counting cocktail (Picofluor 15; Packard).

The relative affinity of PBP2b\*R6 for penicillin G and piperacillin was determined by measuring the quantity of  $\beta$ -lactam necessary to inhibit 50% of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin binding (IC<sub>50</sub>). PBP2b\*R6 (1  $\mu$ M) was incubated with 1  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin and variable concentrations of antibiotics. The mixture was incubated at 37°C for 15 min, denaturing loading buffer was added, and the samples were analyzed by SDS–12.5% PAGE. The procedure to quantify the radioactivity is described above.

The relative affinity of PBP2b\*R6, PBP2b\*R6Thr446Ala, and PBP2b\*CR for penicillin G was determined as follows. The various purified PBP2b\* proteins (0.5  $\mu$ M) were incubated at 37°C for 30 min in buffer B with different concentrations of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin ranging between 0.5  $\mu$ M and 30  $\mu$ M. The reaction was stopped by adding denaturing loading buffer and boiling at 100°C for 5 min. The samples were then subjected to SDS-PAGE, and the procedure to quantify the radioactivity is described above.

The deacylation reaction follows the equation  $-k_3t = \ln [EI^*]_t/[EI^*]_0$ , where  $[EI^*]_0$  is the initial concentration of acyl-enzyme and  $[EI^*]_t$  is its concentration at time t. Determination of  $k_3$  was performed as follows. Ten micromolar purified PBP2b\*R6 was labeled with 10  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin during 15 min at 37°C. A 15 mM excess of cold penicillin G was added, and the incubation was continued at 37°C. Samples were removed at various times, analyzed by SDS-PAGE, and the amount of radioactivity was measured in the protein bands as mentioned above.

TABLE 1. Serotypes and origins of the pneumococcal isolates tested in this study

Strain	Serotype	Site of isolation	Yr of isolation	Geographic origin
R6	Unencapsulated		1930s	United States
5023	3	Blood culture	1999	France
5259	15	Respiratory tract	2000	France
4935	3	Blood culture	1998	France
4790	23	Blood culture	1996	France
5245	6	Sputum	2000	France
5268	14	Superior respiratory tract	2000	France
5204	14	Sputum	1999	France

The activity of the TP domain of PBP2b\*R6 was measured by its ability to hydrolyze the *N*-benzoyl-D-alanylmercaptoacetic acid (S2d) molecule, a synthetic thiolester analog of the cell wall stem peptide, according to the method described by Zhao et al. (36). The thiol group produced by the hydrolysis reaction is coupled to 4,4'-dithiodipyridine, and the formation of this complex is followed by the increase of absorbance at 325 nm, leading to the determination of the  $k_{cat}/K_m$  value.

## RESULTS

**$\beta$ -lactam susceptibility of pneumococcal strains.** Seven clinical pneumococcal strains were isolated in the Bacteriology Laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble at different periods and from different patients. The origins of these strains are shown in Table 1. The MICs of penicillin G and piperacillin for these pneumococcal strains are clearly correlated (Table 2) and span a wide range of values. One isolate, 5023, is penicillin susceptible with a penicillin G MIC of 0.064  $\mu$ g/ml. Two strains (5259 and 4935) present an intermediate susceptibility to penicillin G, as the MICs range between 0.12 and 1  $\mu$ g/ml. The last four strains (4790, 5245, 5268, and 5204) are penicillin-resistant strains, as the MICs are  $>1$   $\mu$ g/ml. The strains 5268 and 5204 are highly resistant to penicillin G, as the MICs are 3 and 6  $\mu$ g/ml, respectively. The pattern observed with piperacillin is slightly different. Strains 5023 and 5259 are considered susceptible to

piperacillin, as the MICs range between 0.05 and 0.1  $\mu$ g/ml, while strains 4935, 4790, 5245, and 5268 display intermediate piperacillin resistance, since the MICs range between 1 and 2  $\mu$ g/ml. Only strain 5204 is highly resistant to piperacillin, with a MIC equal to 4  $\mu$ g/ml.

**DNA sequencing and amino acid alterations in PBP2b from clinical isolates.** Each PBP2b TP domain from CR strains includes numerous nucleotide changes from the corresponding region of strain R6. Comparison of the nucleotide and amino acid changes of each sequence indicates that many mutations are silent (Table 2). Most of these amino acid alterations are located downstream from the TP catalytic motif S<sub>386</sub>VVK (Fig. 1). Amino acid sequences from strains 5268 and 5204 are identical, with the exception of position 351. In addition, a cluster of mutations around the K<sub>615</sub>TG motif are common to the PBP2b of strains 5245, 5268, and 5204 (Fig. 1).

The Thr446Ala mutation, which lies downstream from the conserved S<sub>443</sub>SN catalytic motif, has been identified in all resistant isolates analyzed to date (8, 9, 12–14, 26, 27, 30, 31, 33, 34). This high mutation frequency prompted us to investigate the role of position 446 in the biochemical properties of PBP2b and resistance to  $\beta$ -lactams.

**Purification and characterization of PBP2b\*R6.** The 2,043-bp *pbp2b* gene was amplified by PCR from genomic DNA of the penicillin-sensitive *S. pneumoniae* R6 strain, and its sequence corresponds to the one previously reported (11, 18). The encoded PBP2b amino acid sequence reveals the classical topology shared by all high- $M_r$  PBPs with a very small cytoplasmic domain (M1 to S8), a predicted transmembrane region (I9 to M34), and a large periplasmic region (Q35 to N680) (Fig. 2a). This extracellular region comprises an N-terminal region for which no function has yet been assigned and the TP domain with the conserved amino acid motifs S<sub>386</sub>VVK, S<sub>443</sub>SN, and K<sub>615</sub>TG (Fig. 2a).

The *pbp2b* gene was cloned under the control of an inducible promoter (construct pET30b/*pbp2b*R6). An abundant protein of 74 kDa was observed in *E. coli* extracts upon induction of a bacterial culture harboring pET30b/*pbp2b*R6 (data not shown). The protein was insoluble, probably due to the presence of the transmembrane region.

In previous work, the soluble GST fusion forms of various PBPs from *S. pneumoniae* have been expressed and purified following deletion of their cytoplasmic and transmembrane regions (4, 5, 23, 24). The soluble form of PBP2b of the R6 strain (PBP2b\*R6) was thus constructed by deleting the cytoplasmic and transmembrane regions and by adding a C-terminal His<sub>6</sub> tag (Fig. 2b). Induction of the *E. coli* BL21(DE3) strain bearing pET30b/*pbp2b*\*R6 resulted in the production of a protein migrating on SDS-PAGE with an apparent molecular mass of 70 kDa (Fig. 2c, lane 3), corresponding to the expected molecular mass of PBP2b\*R6. Most of the protein was present in the soluble fraction (Fig. 2c, compare lanes 3 and 4) and was retained efficiently on a nickel-Sepharose resin (Fig. 2c, lane 2). The presence of 50 mM imidazole during protein loading on the column allowed efficient removal of contaminating proteins. PBP2b\*R6 was eluted from the column with 115 mM imidazole and was estimated by SDS-PAGE to be over 95% pure (Fig. 2c, lane 5). This fraction contained a fraction of oligomerized PBP2b\* that was resolved on a gel Superdex G75 as two peaks (data not shown). The second peak corresponds

TABLE 2. MICs and distribution of nucleotide and amino acid substitutions in the TP domains of PBP2b of the seven pneumococcal isolates tested in this study<sup>a</sup>

Strain	Penicillin		Piperacillin		Nucleotides altered <sup>b</sup>	Amino acids altered <sup>b</sup>
	Classification	MIC ( $\mu$ g/ml)	Classification	MIC ( $\mu$ g/ml)		
R6	S	$<0.016$	S	0.016	0	0
5023	S	0.064	S	0.047	39	7
5259	I	0.19	S	0.094	85	15
4935	I	0.5	I	1	75	13
4790	R	1.5	I	1	76	13
5245	R	1.5	I	1.5	138	29
5268	R	3	I	2	186	43
5204	R	6	R	4	182	44

<sup>a</sup> S, susceptible (penicillin G MICs of  $\leq 0.06$   $\mu$ g/ml); I, intermediate (penicillin G MICs from 0.12 to 1  $\mu$ g/ml); R, resistant (penicillin G MICs of  $>1$   $\mu$ g/ml). The region of the *pbp2b* gene coding for the catalytic region of PBP2b, i.e., the TP domain, is comprised from nucleotide 937 to 2,044, which corresponds to amino acids 313 to 680 (the numbering takes into account the Met1).

<sup>b</sup> The published sequence of penicillin-susceptible *S. pneumoniae* R6 was used for comparison.





FIG. 1. Alignment of amino acid sequences of the TP domain from residues 313 to 680 of PBP2b from clinical isolates and from the R6 strain. The catalytic motifs of the TP domain are enclosed in dark boxes, and all the mutations present in clinical isolate sequences, compared to the sequence of PBP2b from the R6 strain, are underlined. The mutations present in at least three of the six penicillin-intermediate and penicillin-resistant clinical isolates are underlined and highlighted by shaded boxes. The stars highlight amino acid substitutions present in all clinical isolates: Thr446Ala, Glu476Gly, and Thr489Ser/Ala.

to a protein with an apparent molecular mass of 70 kDa, confirming the monomeric state of PBP2b\*R6. The purification of monomeric PBP2b\*R6 yielded approximately 50 mg of *E. coli* culture/liter.

The absence of posttranslational modifications on the protein was verified by electrospray ionization mass spectrometry. Indeed, the measured mass of PBP2b\*R6 of 71,024 Da is within the limits of error ( $\pm 8$  Da) of the theoretical mass of 71,022 Da (data not shown). An isoelectric point of 4.95 was determined for PBP2b\*R6 by isoelectric focusing, and this value is close to the calculated one of 5.08 (data not shown).

Purified PBP2b\*R6 was functional with respect to [ $^3$ H]benzylpenicillin binding as shown in Fig. 2d. A 1  $\mu$ M solution of PBP2b\*R6 was mixed with increasing concentrations of labeled antibiotic, and the intensity of binding increased until a plateau was reached at 1  $\mu$ M benzylpenicillin. This stoichiometric binding demonstrated the functional homogeneity of the PBP2b\*R6 preparation.

**$\beta$ -lactam binding on PBP2b\*R6.** The  $\beta$ -lactam acylation efficiency of PBPs is characterized by the constant  $k_2/K$ , which is usually determined by monitoring the decrease in the intrinsic fluorescence of the protein in the presence of  $\beta$ -lactam (21, 23, 24). Unfortunately, we could not rely upon this approach, since PBP2b\*R6 intrinsic fluorescence remains constant following acylation by either piperacillin or penicillin G. Therefore, we used an alternative method based on competitive binding to analyze the affinity of PBP2b\*R6 for  $\beta$ -lactam molecules. The  $IC_{50}$  values were measured (for [ $^3$ H]benzylpenicillin binding), and the data were expressed as relative values compared to those for penicillin G (Table 3). We performed  $IC_{50}$  measurements with PBP2b\*R6 and PBP2x\*R6 in order to compare the affinity patterns of both class B PBPs from *S. pneumoniae* for  $\beta$ -lactams (23, 24). The patterns of reactivity for both PBPs towards piperacillin and cefotaxime are clearly

different. The affinity of PBP2b\*R6 for piperacillin is nearly sevenfold higher than that of PBP2x\*R6, whereas affinity of PBP2b\*R6 for cefotaxime is at least 10-fold lower than that of PBP2x\*R6.

The efficiency of hydrolysis,  $k_{cat}/K_m$  value, of PBP2b\*R6 was determined using the substrate analogue S2d. The efficiency of hydrolysis of S2d thiolester by PBP2b\*R6 is 10- to 100-fold lower than the efficiency obtained when using other *S. pneumoniae* PBPs from the R6 strain (5, 6). The value obtained ( $80 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) is three- to fourfold higher than the value of PBP2x\* from a CR isolate ( $20 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) but 30-fold lower than that for the sensitive PBP2x\* ( $2,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (23, 24).

The  $k_3$  deacylation rate ( $3.8 \times 10^{-5} \cdot \text{s}^{-1}$ ) of PBP2b\*R6 for penicillin G is in the same range as those reported for other *S. pneumoniae* PBPs originating either from sensitive or resistant strains (4-7, 23, 24).

**Affinity for penicillin G of PBP2b\* variants.** PBP2b\* variants from sensitive (PBP2b\*R6) and CR strains (PBP2b\*CR) were compared with respect to their affinity for penicillin G following purification of the various recombinant proteins (Fig. 3). PBP2b\* from the penicillin-susceptible strain 5023 has a penicillin G affinity reduced by more than 85% compared to that of PBP2b\*R6, whereas PBP2b\* from intermediate and resistant penicillin strains 5259, 4935, and 4790 harbor a pen-

TABLE 3. Enzymatic parameters of PBP2b\*R6<sup>a</sup>

Variant	Relative value compared to penicillin $IC_{50}$ (%)		$k_3$ ( $\text{s}^{-1}$ ) for penicillin G	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) for S2d
	Piperacillin	Cefotaxime		
PBP2b*	44	>1,300	$3.8 \times 10^{-5}$	80
PBP2x*	300	130		

<sup>a</sup> Data were obtained from two to three independent experiments.

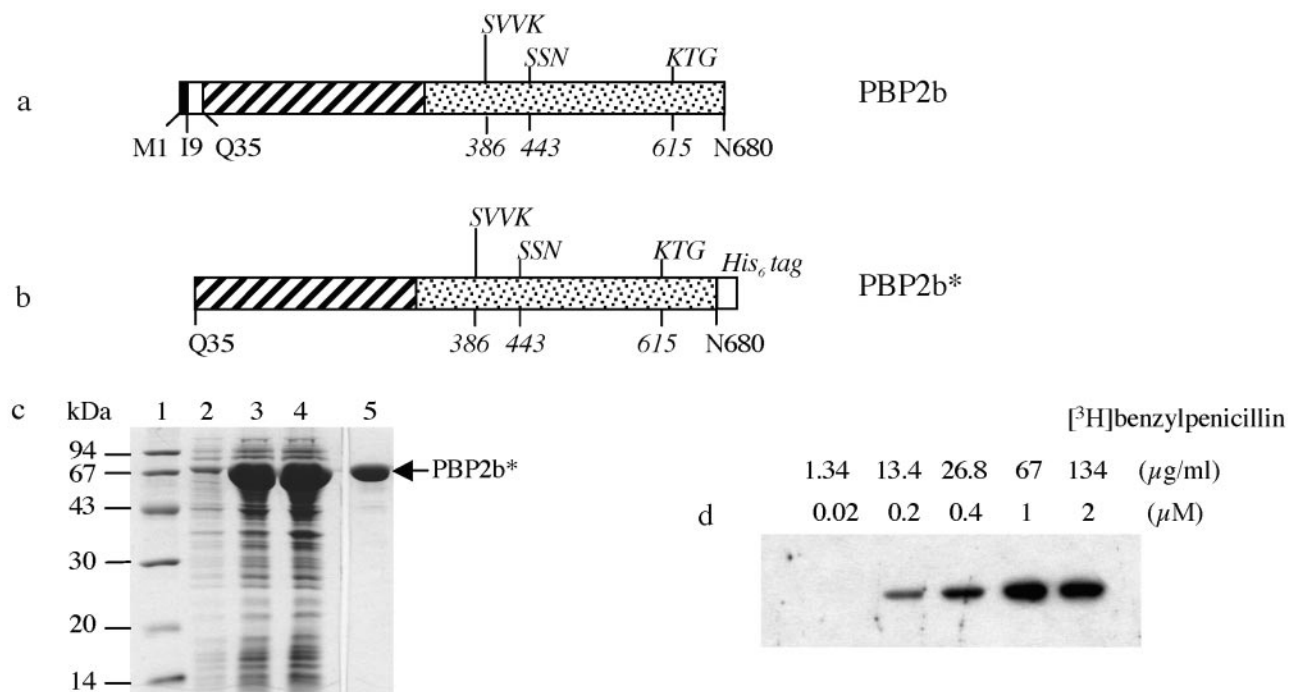


FIG. 2. Expression and purification of PBP2b\*R6. (a) Schematic representation of the native PBP2b protein. The solid and empty boxes indicate the cytoplasmic domain and the membrane anchor, respectively. In the periplasmic region, the N-terminal and the TP domains are represented by hatched and dotted boxes, respectively. The conserved motifs of the TP domain are indicated above the boxes (with the first position numbered in *italics* below). (b) Schematic representation of the construct yielding the soluble form of PBP2b\*R6. The His<sub>6</sub> tag added in the C terminus of PBP2b\* is shown (shadowed box). (c) Expression and purification of PBP2b\*R6. Proteins were separated by SDS–12.5% PAGE and stained with Coomassie blue. Lanes: 1, standard molecular mass markers; 2, flowthrough from nickel column; 3, total cell lysate; 4, soluble supernatant following cell lysis; 5, protein eluted at 115 mM imidazole. (d) Saturation binding of PBP2b\* by [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin. Fluorogram of a SDS–12.5% PAGE dried gel of PBP2b\* (1 μM) labeled with different concentrations of [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin indicated above the gel.

icillin G affinity that is reduced by about 90%. The PBP2b\* with the most reduced measurable penicillin G affinity came from strains 5245 and 5268, with decreases of 95% and 99%, respectively. In our experimental conditions, no binding was observed with PBP2b\* from strain 5204, even with the highest

[<sup>3</sup>H]benzylpenicillin concentration, indicating a major reduction of affinity for the antibiotic.

In order to characterize the role of the Thr446Ala mutation in PBP2bCRs, this mutation was introduced into PBP2b\*R6. The mutant (PBP2b\*R6Thr446Ala) was expressed and purified in a similar manner as the wild-type protein (PBP2b\*R6). The unique point mutation Thr446Ala in PBP2b\*R6 decreases the affinity for penicillin G by 60% compared to that of the wild-type protein (Fig. 3).

**Effect of PBP2b variants on MICs for *S. pneumoniae* R6.** Plasmids bearing genes encoding PBP2b\*R6Thr446Ala or the various PBP2b\*CRs were used to transform competent *S. pneumoniae* R6 cells. Recombinant strains were selected by using either penicillin G or piperacillin. Despite repeated attempts, no penicillin G-resistant clones were obtained following transformation with the PBP2b\*R6Thr446Ala or PBP2b\*CR genes, indicating that neither the point mutation nor the CR sequences reduce the sensitivity of R6 for penicillin G to allow selection, which indicates that other modified PBPs are probably involved in the increase of the MICs for the CR strains.

At the highest piperacillin concentration allowing recombinant strain growth, three to six independent clones were isolated, and the absence of contamination by other bacterial species was checked. The MIC of piperacillin for the *S. pneumoniae* R6 bearing the PBP2b\*R6Thr446Ala gene is 0.032 μg/ml, an increase of twofold over that for the parental R6

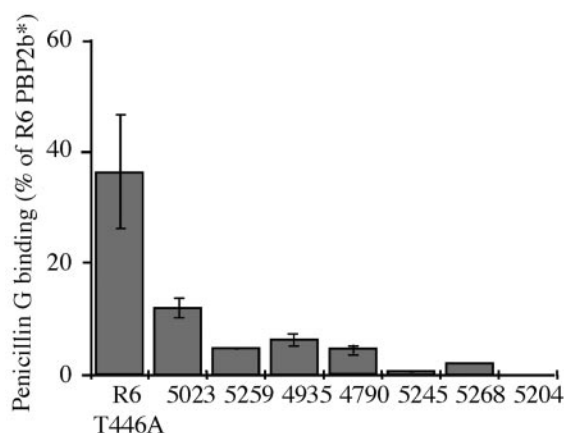


FIG. 3. Relative affinity of PBP2b\* proteins for penicillin G. The various purified PBP2b\* proteins (0.5 μM) were incubated at 37°C for 30 min with 2 μM [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin. All components were added at the same time, and the reaction was stopped by adding denaturing loading buffer. The affinity for penicillin G for each protein is expressed as a percentage of the PBP2b\*R6 value.



strain ( $<0.016$   $\mu\text{g/ml}$ ). As expected, the recombinant strains had a sensitivity to penicillin G as high as the one displayed by R6 ( $<0.016$   $\mu\text{g/ml}$ ).

Except for transformants obtained with CR *pbp2b* originating from strain 5023, for which the piperacillin MIC was 0.023 to 0.047  $\mu\text{g/ml}$ , all other strains produced similar MICs of 0.032 to 0.047  $\mu\text{g/ml}$ . These values are at least double the one for R6 (0.016  $\mu\text{g/ml}$ ). For transformants originating from CR strains 5023, 5259, 4935, 4790, 5245, and 5204, the penicillin G MIC was 0.016 to 0.023  $\mu\text{g/ml}$ . The MICs for clones transformed with PBP2b\*CR from strain 5268 were 0.016 to 0.032  $\mu\text{g/ml}$ . In all cases, the MICs were higher than the one for R6 ( $<0.016$   $\mu\text{g/ml}$ ).

In order to further investigate the influence of PBP2b\* on  $\beta$ -lactam affinity, the Ala446 was mutated back to Thr in all seven PBP2b\*CRs and was used to transform the R6 strain. Piperacillin-resistant transformants could be selected following transformation with five reversed CR *pbp2b*\* sequences but, despite repeated attempts, not with sequences originating from strains 5023 and 5259. The MICs for all five transformants did not differ significantly from those obtained with the nonmutated PBP2b sequences (data not shown).

Recombinant clones were selected with piperacillin following transformation of R6 with each of the seven PBP2b\*CR genes. Sequencing of the *pbp2b* genes isolated from some piperacillin-resistant transformants revealed that part of the 3' region of the *pbp2b* sequence encoding for a region of the TP domain (around amino acid 520 to 530 to the C terminus of PBP2b) did not recombine with the R6 *pbp2b* gene. Extending the end of the CR *pbp2b* genes used for the transformation by 660 nucleotides did not result in a significant modification of the recombination event. Therefore, the transformants express a hybrid PBP2b protein in which the C terminus originates from R6 PBP2b.

## DISCUSSION

$\beta$ -lactam-resistant *S. pneumoniae* strains isolated in hospitals harbor high- $M_r$  *pbp* genes with mosaic structures. The mosaicity of *S. pneumoniae* *pbp* genes results from recombination events between *S. pneumoniae* and *S. mitis* (8–10). Consequently, sequences of PBP2x, PBP2b, and PBP1a isolated from CR strains carry many amino acid changes compared to those of PBPs from susceptible strains, with only a fraction likely being related to the reduction of PBP affinity for  $\beta$ -lactam antibiotics. An understanding of the consequences of such mutations at a biochemical level requires the in vitro analysis of purified PBPs. For instance, a subset of mutations within the TP domain of PBP2x has been implicated in its reduction of inhibition efficiency by cefotaxime and increased *S. pneumoniae* resistance to  $\beta$ -lactams (1, 23, 24). PBP2b is the primary mutated PBP when piperacillin selection is applied to *S. pneumoniae* cultures in the laboratory (22, 29). We present here the enzymatic characteristics of PBP2b and show that PBP2b proteins from CR strains have a reduced in vitro affinity for  $\beta$ -lactams. Moreover, we have identified, among tens of mutations, Thr446Ala of the TP domain as a molecular determinant for resistance to piperacillin.

We have cloned, expressed, and purified the periplasmic region of the *S. pneumoniae* PBP2b from the R6  $\beta$ -lactam-

sensitive strain (PBP2b\*R6) and from seven CR strains isolated in Grenoble, France. The in vitro characterization of PBP2b\*R6 provides a rationale for the PBP2b reactivity pattern towards  $\beta$ -lactams (20). Since PBP2b is the sole mutated high- $M_r$  PBP under piperacillin selection (22, 29), it is understandable that PBP2b should harbor the highest piperacillin affinity among the five *S. pneumoniae* high- $M_r$  PBPs. The relatively low affinity of PBP2b\*R6 for cefotaxime appears to be in the same range as the values obtained previously with PBP1a\*R6 and PBP2a\*R6 (5, 6). This is in accordance with the low mutational susceptibility of the *pbp2b* gene under cefotaxime selection (17–19).

PBP2b\*CRs which display the highest in vitro reduction in affinity (95 to 99%) for penicillin G are from strains 5245, 5268, and 5204. These proteins harbor a common set of point mutations localized around the  $K_{615}TG$  motif (Fig. 1), which are also found in PBP2b from highly penicillin-resistant strains (penicillin G MICs of 2 to 8  $\mu\text{g/ml}$ ) (2, 12, 33). The role of some of these substitutions may be proposed by the light of tridimensional structure of *S. pneumoniae* PBP2x (16, 28). In PBP2b, Ala619, downstream of the  $K_{615}TG$  motif, is proposed to be part of the strand  $\beta_3$  bordering the active site cleft. Thus, mutation Ala619Gly might increase the flexibility of the  $\beta_3$  strand and, in consequence, modify the kinetics of  $\beta$ -lactam binding. On the other hand, amino acids Asn659, Gly660, and Ser664 are most probably located at the N terminus of helix  $\alpha_{11}$ ; thus, their mutation into Lys, Asn, and Ala, respectively, might induce structural rearrangements near the active site and again interfere with antibiotic binding. Unfortunately, the effect of these mutations in PBP2b of strains 5245, 5268, and 5204 could not be investigated in vivo. We observed that, once recombined into the R6 genome, these CR *pbp2b*\* genes lacked a fragment encoding a region around positions 525 to 680, which includes the  $K_{615}TG$  motif. Extension of the DNA fragment used for recombination by 660 bp downstream of the 3' end of the *pbp2b* genes did not allow insertion of the full gene. This problem is specific to the PBP2b gene, as PBP2x could be fully recombined into the R6 genome (1). It might be that the C-terminal region of PBP2bCR sequences is incompatible with the expression in R6. Indeed, a complex relationship between PBPs had been inferred previously (1).

The R6 strain transformed with sequences originating from the seven CR strains provided recombinant *S. pneumoniae* for which the MIC of penicillin G was within a narrow range (0.016 to 0.032  $\mu\text{g/ml}$ ), contrary to the MIC for the donor CR strains (0.064 to 6  $\mu\text{g/ml}$ ). This threshold effect is likely due to the high penicillin G sensitivity of the host strain PBP1a (1, 2, 25). Similarly, the MICs of piperacillin for the recombinant strains do not exceed 0.023 to 0.047  $\mu\text{g/ml}$ , whereas the corresponding values for the CR strains range from 0.047 to 4  $\mu\text{g/ml}$ . The MIC for the recombinant strain obtained with the PBP2b sequence from strain 5023 is similar to that for the donor CR strain. Indeed, this PBP2b TP sequence is close to the one from R6 PBP2b, with only seven amino acid changes. In strain 5023, the PBP1a sequence is identical to the one from R6, contrary to the six other CR strains studied here. Therefore, it is likely that the threshold effect for piperacillin observed in our recombined strains is also due to the R6 PBP1a sensitivity for the antibiotic. Indeed, it has recently been shown that the threshold effect for penicillin G resistance observed in

our recombinant strains is due to the R6 PBP1a and PBP2x proteins (Chesnel et al., unpublished results).

The analysis of the amino acid sequences of the TP domain of PBP2b from the seven CR strains revealed that the most predominant mutations are Thr446Ala, Glu476Gly, and Thr489Ser/Ala, which have been identified in other CR strains around the world (8, 9, 12–14, 26, 27, 30, 31, 33, 34). The amino acid sequences of the TP domain of PBP2b from strains 5023, 5259, 4935, and 4790 are already represented in databases, contrary to sequences from our most highly resistant strains 5245, 5268, and 5204, which are new. The preponderance of the Thr446Ala mutation in CR isolates and in laboratory resistant strains (17), as well as its juxtaposition to a key motif of PBP function (S<sub>443</sub>SN), led us to investigate the role of this mutation in detail. To achieve this purpose, the Thr446Ala mutation was introduced into PBP2b\*R6, leading to the protein PBP2b\*R6Thr446Ala. The measurements of relative affinity for penicillin G showed that the point mutation Thr446Ala in PBP2b\*R6 decreases the affinity for penicillin G by 60%, compared to that of the wild-type protein. When this mutation was introduced into *S. pneumoniae* strain R6, the MIC of piperacillin increased twofold. These results show that the Thr446Ala mutation in PBP2b from the R6 strain directs the affinity for  $\beta$ -lactams. Surprisingly, when the reverse experiment was attempted, that is, the insertion in the R6 genome of PBP2b\*CRs with the Ala446Thr mutation, the piperacillin MICs for the resulting five strains that could be selected were similar to those for the nonmutated strains. The absence of the C-terminal region of the TP domain might be responsible for this effect. Moreover, the inability to select R6 transformants expressing PBP2bCRA446Thr from strains 5023 and 5259 might indicate that the mutation has lowered the MIC to a level comparable to that for the R6 strain. The MICs for strains 5023 and 5259 were the lowest among our selection of strains. Taken together, these results illustrate the complex relationship between mutation at position 446 and other mutations present in PBP2bCR sequences.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a fellowship to L.C., a grant from the Rhône-Alpes region, and European Commission grant LSMH-CT-2003-503335. E.P. is a recipient of a CEA CFR fellowship.

We are much indebted to Nicolas Mouz (Protein'eXpert, Grenoble, France) for excellent advice on recombinant protein expression. We thank Genome Express for providing DNA sequencing services. We are very grateful to Andréa Dessen and André Zapun (Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Grenoble, France) for constructive comments and critical review of the manuscript.

#### REFERENCES

- Chesnel, L., L. Pernot, D. Lemaire, D. Champelovier, J. Croize, O. Dideberg, T. Vernet, and A. Zapun. 2003. The structural modifications induced by the M339F substitution in PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* further decreases the susceptibility to beta-lactams of resistant strains. *J. Biol. Chem.* **278**:44448–44456.
- Coffey, T. J., M. Daniels, L. K. McDougal, C. G. Dowson, F. C. Tenover, and B. G. Spratt. 1995. Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1306–1313.
- Di Guilmi, A. M., A. Dessen, O. Dideberg, and T. Vernet. 2003. The glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* catalyzes the polymerization of murein glycan chains. *J. Bacteriol.* **185**:4418–4423.
- Di Guilmi, A. M., A. Dessen, O. Dideberg, and T. Vernet. 2003. Functional characterization of penicillin-binding protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185**:1650–1658.
- Di Guilmi, A. M., N. Mouz, J. P. Andrieu, J. Hoskins, S. R. Jaskunas, J. Gagnon, O. Dideberg, and T. Vernet. 1998. Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a. *J. Bacteriol.* **180**:5652–5659.
- Di Guilmi, A. M., N. Mouz, L. Martin, J. Hoskins, S. R. Jaskunas, O. Dideberg, and T. Vernet. 1999. Glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* is membrane associated. *J. Bacteriol.* **181**:2773–2781.
- Di Guilmi, A. M., N. Mouz, Y. Petitot, E. Forest, O. Dideberg, and T. Vernet. 2000. Deacylation kinetics analysis of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2x mutants resistant to beta-lactam antibiotics using electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **284**:240–246.
- Dowson, C. G., T. J. Coffey, C. Kell, and R. A. Whitley. 1993. Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **9**:635–643.
- Dowson, C. G., A. Hutchison, J. A. Brannigan, R. C. George, D. Hansman, J. Linares, A. Tomasz, J. M. Smith, and B. G. Spratt. 1989. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:8842–8846.
- Dowson, C. G., A. Hutchison, and B. G. Spratt. 1989. Extensive re-modelling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **3**:95–102.
- Dowson, C. G., A. Hutchison, and B. G. Spratt. 1989. Nucleotide sequence of the penicillin-binding protein 2B gene of *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Nucleic Acids Res.* **17**:7518.
- du Plessis, M., E. Bingen, and K. P. Klugman. 2002. Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2349–2357.
- Enright, M. C., and B. G. Spratt. 1999. Extensive variation in the *ddl* gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* results from a hitchhiking effect driven by the penicillin-binding protein 2b gene. *Mol. Biol. Evol.* **16**:1687–1695.
- Ferroni, A., and P. Berche. 2001. Alterations to penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X amongst penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F from the nasopharyngeal flora of children. *J. Med. Microbiol.* **50**:828–832.
- Goffin, C., and J. M. Ghuyssen. 2002. Biochemistry and comparative genomics of SxxK superfamily acyltransferases offer a clue to the mycobacterial paradox: presence of penicillin-susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:702–738.
- Gordon, E., N. Mouz, E. Duee, and O. Dideberg. 2000. The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J. Mol. Biol.* **299**:477–485.
- Grebe, T., and R. Hakenbeck. 1996. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:829–834.
- Hakenbeck, R., A. König, I. Kern, M. van der Linden, W. Keck, D. Billot-Klein, R. Legrand, B. Schoot, and L. Gutmann. 1998. Acquisition of five high-*M<sub>r</sub>* penicillin-binding protein variants during transfer of high-level  $\beta$ -lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **180**:1831–1840.
- Hakenbeck, R., C. Martin, C. Dowson, and T. Grebe. 1994. Penicillin-binding protein 2b of *Streptococcus pneumoniae* in piperacillin-resistant laboratory mutants. *J. Bacteriol.* **176**:5574–5577.
- Hakenbeck, R., S. Tornette, and N. F. Adkinson. 1987. Interaction of non-lytic beta-lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:755–760.
- Jamin, M., C. Damblon, S. Millier, R. Hakenbeck, and J. M. Frère. 1993. Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: enzymic activities and interactions with beta-lactams. *Biochem. J.* **292**:735–741.
- Krauss, J., M. van der Linden, T. Grebe, and R. Hakenbeck. 1996. Penicillin-binding proteins 2x and 2b as primary PBP targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* **2**:183–186.
- Mouz, N., A. M. Di Guilmi, E. Gordon, R. Hakenbeck, O. Dideberg, and T. Vernet. 1999. Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. *J. Biol. Chem.* **274**:19175–19180.
- Mouz, N., E. Gordon, A. M. Di Guilmi, I. Petit, Y. Petitot, Y. Dupont, R. Hakenbeck, T. Vernet, and O. Dideberg. 1998. Identification of a structural determinant for resistance to beta-lactam antibiotics in gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:13403–13406.
- Munoz, R., C. G. Dowson, M. Daniels, T. J. Coffey, C. Martin, R. Hakenbeck, and B. G. Spratt. 1992. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **6**:2461–2465.
- Nagai, K., T. A. Davies, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum. 2002. Effects of

- amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1273–1280.
27. **Nichol, K. A., G. G. Zhanel, and D. J. Hoban.** 2002. Penicillin-binding protein 1A, 2B, and 2X alterations in Canadian isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3261–3264.
28. **Pares, S., N. Mouz, Y. Petillot, R. Hakenbeck, and O. Dideberg.** 1996. X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat. Struct. Biol.* **3**:284–289.
29. **Reichmann, P., A. Konig, A. Marton, and R. Hakenbeck.** 1996. Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* **2**:177–181.
30. **Rieux, V., C. Carbon, and E. Azoulay-Dupuis.** 2001. Complex relationship between acquisition of beta-lactam resistance and loss of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **184**:66–72.
31. **Sa-Leao, R., S. E. Vilhelmsson, H. de Lencastre, K. G. Kristinsson, and A. Tomasz.** 2002. Diversity of penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* circulating in Iceland after the introduction of penicillin-resistant clone Spain(6B)-2. *J. Infect. Dis.* **186**:966–975.
32. **Schwartz, B., J. A. Markwalder, S. P. Seitz, Y. Wang, and R. L. Stein.** 2002. A kinetic characterization of the glycosyltransferase activity of *Escherichia coli* PBP1b and development of a continuous fluorescence assay. *Biochemistry* **41**:12552–12561.
33. **Smith, A. M., and K. P. Klugman.** 1995. Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:859–867.
34. **Song, J. H., J. W. Yang, J. H. Jin, S. W. Kim, C. K. Kim, H. Lee, K. R. Peck, S. Kim, N. Y. Lee, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, et al.** 2000. Molecular characterization of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1641–1644.
35. **Tipper, D. J., and J. L. Strominger.** 1965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**:1133–1141.
36. **Zhao, G., W. K. Yeh, R. H. Carnahan, J. Flokowitsch, T. I. Meier, W. E. Alborn, Jr., G. W. Becker, and S. R. Jaskunas.** 1997. Biochemical characterization of penicillin-resistant and -sensitive penicillin-binding protein 2x transpeptidase activities of *Streptococcus pneumoniae* and mechanistic implications in bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Bacteriol.* **179**:4901–4908.